

Aus dem Institut für Immunologie
des Zentrums für klinische Pathologie



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Direktor Prof. Bernhard Fleischer

Identifizierung und molekulare Charakterisierung von Zielproteinen von Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Wolfgang Koestner

aus Hannover

Hamburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:
veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

meiner Frau Eva

3.1.7	Plasmidkonstrukte	49
3.1.8	Proteinbiochemische Reagenzien.....	49
3.2	<i>Methoden</i>	51
3.2.1	Vorbemerkung über die verwendeten Expressionskonstrukte und Zelllinien	51
3.2.2	Transiente Transfektion von Lymphomzellen	53
3.2.3	Präparation muriner Lymphknoten- und Milzzellen	53
3.2.4	Depletion von B-Zellen.....	55
3.2.5	Stimulation von Zellen mit Natrium-Ortho-Vanadat (Vanadat)	55
3.2.6	Stimulation von Zellen mit α -CD3, PMA und Ionomycin	55
3.2.7	Behandlung von Zellen mit 32 P-NAD	55
3.2.8	Behandlung von Zellen mit etheno-NAD	56
3.2.9	Behandlung von Zellen mit PI-PLC.....	56
3.2.10	Lysieren von Zellen	56
3.2.11	" Fluorescence activated cell sorter " (FACS).....	56
3.2.12	Sortieren von Zellen.....	57
3.2.13	Immunpräzipitation.....	57
3.2.14	SDS-PAGE	58
3.2.15	Westernblot.....	58
3.2.16	Colloidal Coomassie-Färbung:.....	58
3.2.17	Silberfärbung.....	59
3.2.18	Immundetektion und Chemilumineszenzreaktion.....	59
3.2.19	Strippen von PVDF-Membranen	59
3.2.20	Proteinsequenzierung durch Nano-Elektrospray-Massenspektroskopie	59
4	Ergebnisse	62
4.1	<i>Detektion von etheno-ADP-Ribosylierung mit dem monoklonalen Antikörper IG4</i>	62
4.1.1	Durchflußzytometrische Untersuchungen von etheno-ADP-Ribosylierung	63
	mit dem IG4-Antikörper.....	63
4.1.2	Vergleich der Methoden etheno-NAD/IG4-Westernblot	65
	und 32 P-NAD/Autoradiographie zur Darstellung von ART-Zielproteinen	65
4.1.3	Untersuchung von ADP-Ribosylierung in <i>trans</i> -Stellung.....	72
4.1.4	Untersuchung von chimären Varianten aus Maus- und Ratten-ART2.....	74
4.1.5	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen CD38 und ARTs in <i>cis</i> -Stellung	78
4.2	<i>Zielproteine der ARTs</i>	81
4.2.1	Etheno-ADP-ribosylierung von LFA-1, CD44 und CD45.....	81
4.2.2	Etheno-ADP-Ribosylierung von LFA-1 und CD44 durch unterschiedliche ARTs	83

4.2.3	ADP-ribosylierung der α -Kette von humanem CD8	85
4.2.4	Verschiedene ARTs besitzen Auto-ADP-Ribosyltransferaseaktivität	87
4.2.5	Identifizierung neuer Zielproteine mittels Nano-Elektrospray- Massenspektroskopie .90	
4.2.6	Bestätigung von DEC-205 als Zielprotein von ARTs mittels Immunpräzipitation	94
4.3	<i>Interaktionen zwischen ADP-Ribosylierung und Tyrosinphosphorylierung</i>	96
4.3.1	Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinasen	
	in DC27.10-Zellen	96
4.3.2	Ethno-ADP-Ribosylierung des unbekanntes 80 kDa großen Proteins (p80)	
	durch unterschiedliche ARTs.....	98
4.3.3	Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinasen	
	in primären Maus-Lymphknoten-Zellen	99
4.3.4	Untersuchung des p80 mit einem PAG-spezifischen Antikörper.....	103
4.3.5	Interaktionen zwischen ART-Zielproteinen und der Tyrosinkinase Lck	105
4.3.6	Interaktionen zwischen ART-Zielproteinen und mART2.2.....	106
5	Diskussion	107
5.1	<i>Beurteilung des ethno-NAD-1G4-Assays</i>	107
5.2	<i>Überlegungen zur Zielproteinspezifität eukaryotischer ART</i>	110
5.3	<i>Überlegungen zur ADP-Ribosylierung im Rahmen der immunologischen Synapse</i>	112
5.4	<i>Überlegungen zu den neu identifizierten Zielproteinen Neuropilin-1 und DEC-205</i>	112
5.5	<i>Beurteilung der Ergebnisse an chimären Varianten aus mART2.2 und rtART2.2</i>	114
5.6	<i>Beurteilung des Zusammenspiels zwischen CD38 und ARTs</i>	114
5.7	<i>Überlegungen zur Signaltransduktionskaskade der ADP-Ribosylierungsreaktion</i>	117
5.8	<i>Beurteilung der Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinasen</i> ...	118
6	Perspektiven	120
7	Zusammenfassung	121
8	Literaturverzeichnis	122
9	Danksagung	132
10	Lebenslauf	133

11	Publikationen und Präsentationen:	134
12	ERKLÄRUNG.....	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Signaltransduktion in T-Zellen	21
Abbildung 2:	Schem. Darstellung der Reifung dendritischer Zellen	23
Abbildung 3:	Schem. Darstellung des „Recycling-Zyklus“ von MMR und DEC-205	25
Abbildung 4:	Modell zur Bildung der immunologischen Synapse	27
Abbildung 5:	Schem. Darstellung der "lipid rafts" in T-Zellen	30
Abbildung 6:	Schem. Darstellung der ADP-Ribosylierungsreaktion	32
Abbildung 7:	Schem. Darstellung der ADP-Ribosylierung <i>in cis</i> und <i>trans</i>	39
Abbildung 8:	Schem. Darstellung des pME-Vektors	51
Abbildung 9:	Schem. Darstellung des pTRE-Vektors	52
Abbildung 10:	Lage der lymphatischen Organe bei der Maus	54
Abbildung 11:	Darstellung eines MS/MS-Q-TOF-Massenspektrometers	60
Abbildung 12:	Schem. Darstellung des etheno-NAD/1G4-Assays	62
Abbildung 13:	Darstellung von etheno-ADP-Ribosylierung im FACS	64
Abbildung 14:	Vergleich von etheno-NAD- und ³² P-NAD-Markierung in DC2710-Zellen	66
Abbildung 15:	Vergleich von etheno-NAD- und ³² P-NAD-Markierung in Jurkat-Zellen	68
Abbildung 16:	Darstellung von Zielproteinen der ARTs innerhalb der Fraktion der GPI verankerten Proteine in DC2710-Zellen.	70
Abbildung 17:	Darstellung von Zielproteinen der ARTs innerhalb der Fraktion der GPI verankerten Proteine in Jurkat-Zellen	71
Abbildung 18:	Untersuchung von <i>trans</i> -ADP-ribosylierung	72
Abbildung 19:	Schem. Darstellung chimärer Konstrukte aus rtART2.2 (RT6.2) und mART2.2	75
Abbildung 20:	Darstellung der etheno-ADP-ribosylierung von DC27.10 ^{NOD/DA} und DC27.10 ^{DA/NOD} im FACS	76
Abbildung 21:	Darstellung der Zelloberflächen ADP-ribosylierung von DC27.10 ^{NOD/DA} und DC27.10 ^{DA/NOD} im Westernblot	77

Abbildung 22:	Schem. Darstellung der CD38-ADP-Cyclase-Reaktion	78
Abbildung 23:	Interaktion von hART1 und CD38 in <i>cis</i> -Stellung	79
Abbildung 24:	Darstellung der Zielproteine LFA-1, CD45 und CD44 mittels Immunpräzipitation und 1G4 Westernblotanalyse	81
Abbildung 25:	ADP-Ribosylierung von LFA-1 durch unterschiedliche ARTs	83
Abbildung 26:	ADP-Ribosylierung von CD44 durch unterschiedliche ARTs	84
Abbildung 27:	ADP-Ribosylierung von CD8-alpha durch hART1	85
Abbildung 28:	Automodifikation von ARTs	88
Abbildung 29:	Massenspektroskopische Analyse von 1G4-Immunpräzipitaten	90
Abbildung 30:	Aminosäuresequenz der durch Massenspektroskopie identifizierten Proteine	93
Abbildung 31:	Bestätigung von DEC-205 als Zielprotein der ARTs	94
Abbildung 32:	Interaktionen zwischen ARTs und Tyrosinkinasen in DC27.10-Zellen	96
Abbildung 33:	Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinasen in DC27.10-Zellen	97
Abbildung 34:	ADP-Ribosylierung des 80 kDa großen Proteins durch unterschiedliche ARTs	98
Abbildung 35:	Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinasen in Maus Lymphknoten-Zellen (1G4-Präzipitate)	100
Abbildung 36:	Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinasen in Maus Lymphknoten-Zellen (4G10-Präzipitate)	102
Abbildung 37:	Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinasen in Maus Lymphknoten-Zellen	102
Abbildung 38:	Untersuchung des p80 mit PAG spezifischem Antikörper im Westernblot	104
Abbildung 39:	Interaktionen zwischen ART-Zielproteinen und Lck sowie ART-Zielproteinen und mART2.2	105

Zusammenfassung

Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) sind Enzyme, die NAD unter Freisetzung von Nicotinamid spalten und den Transfer von ADP-Ribose auf Zielproteine katalysieren. Bekannte bakterielle ARTs sind z.B. *Cholera-* und *Pertussistoxin*, die die Signaltransduktion in Wirtszellen durch ADP-Ribosylierung von G-Proteinen hemmen. Toxin-verwandte eukaryotische ARTs inhibieren elementare Zellfunktionen auf Lymphozyten. Ziel dieser Arbeit war es, Zielproteine eukaryotischer ARTs zu identifizieren und zu charakterisieren, die den Ausgangspunkt für das Verständnis der Wirkung von ARTs in T-Zellen bilden könnten.

Zu diesem Zweck wurde ein Antikörper-basierter Assay zum Nachweis von ADP-Ribosylierung auf der Zelloberfläche etabliert. Unter Verwendung eines mit einer etheno-Gruppe modifizierten NADs (etheno-NAD) und unter Verwendung des für etheno-Adenosin spezifischen Antikörpers 1G4 wurden etheno-ADP-ribosylierte Zielproteine im FACS und im Westernblot dargestellt. Durch massenspektroskopische Untersuchung von 1G4-Immunpräzipitaten gelang der Nachweis neuer ART-Zielproteine.

Im Westernblot konnte die ADP-Ribosylierung bekannter Zielproteine wie LFA-1, CD44 und CD45 bestätigt werden. Außerdem wurde erstmals humanes CD8 α als Zielprotein von hART1 *in vitro* nachgewiesen. Daneben wurde untersucht, inwiefern der enzymatische Abbau durch das NAD verstoffwechselnde Ektoenzym CD38 die Verfügbarkeit von extrazellulärem NAD als Substrat für hART1 begrenzt. Dabei konnte eine CD38 vermittelte Hemmung der ADP-Ribosylierung *in cis* nachgewiesen werden. Mittels massenspektroskopischer Analyse konnten DEC-205 und Neuropillin-1 als neue Zielproteine von ARTs identifiziert werden. Des Weiteren wurden Hsp 70 und Hsp 90 als mögliche Interaktionspartner von ART-Zielproteinen identifiziert. Um Schnittstellen zwischen ART-Zielproteinen und der Signaltransduktion von T-Zellen herzustellen, wurden Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinase untersucht. Tatsächlich zeigten sich zahlreiche solcher Interaktionen in primären Maus T-Zellen. Es fanden sich ferner Hinweise darauf, dass zwei dieser Proteine mit Molekulargewichten von ca. 64 und

80 kDa in die frühe Signaltransduktion von T-Zellen involviert sein könnten. Die Identifizierung dieser Proteine erscheint vielversprechend, um die Beziehung zwischen ART-Zielproteinen und der T-Zell-Signaltransduktion zu verstehen.

Zusammengefasst bieten die neu identifizierten Zielproteine wichtige Grundlagen, um die Effekte eukaryotischer ARTs aufzuklären zu können.

Abstract

Mono-ADP-ribosyltransferases (ARTs) are enzymes, which cleave NAD and catalyse the transfer from ADP-ribose onto target proteins while nicotinamid is released. Well known bacterial toxins are ARTs such as cholera- or pertussistoxin, who inhibit the signal transduction through ADP-ribosylation of G proteins. Toxin-related eukaryotic ARTs suppress elementary cell functions of T lymphocytes. The aim of this work was to identify and to characterise target proteins of eukaryotic ARTs as a starting point to understand these ART mediated mechanisms.

Therefore an antibody-based assay to detect ADP-ribosylation was established. An antibody specific for etheno-adenosine could identify etheno-ADP-ribosylated target proteins in FACS- and western blot analysis using etheno-NAD as a substrate.

The method was validated on known target proteins in western blot analysis and used to identify new target proteins using mass spectrometry. It could be shown that human CD8-alpha can be modified by human ART1 *in vitro* as has been seen for mouse CD8-alpha before. The influence of the NAD ectoenzyme CD38 on ADP-ribosylation was analysed. A CD38 mediated inhibition of ADP-ribosylation *in cis* could be demonstrated. Using mass spectrometry analysis DEC-205 and Neuropillin-1 could be identified as new target proteins of ARTs. Furthermore Hsp 70 und Hsp 90 were determined as possible interacting with ART-target proteins. To locate interfaces in the signal transduction interactions between ART targets and tyrosine kinases were analysed. Indeed several of such interactions could be detected in primary mouse T cells. Two of these interacting proteins with molecular weights of about 64 and 80 kDa seemed to be involved in the early signal transduction of T cells. The identification of these targets holds promise to understand the relationship of ART target proteins and T cell signal transduction.

Abkürzungsverzeichnis

ADP-Ribose	Adenosin-Di-phosphat-Ribose
APC	„antigen presenting cell“ (Antigen präsentierende Zelle)
ART	ADP-Ribosyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	„Bovine-serum-albumin“
CD	“Cluster of differentiation”
CTL	Zytotoxische T-Zelle („cytotoxic T cells“)
DC	Dendritische Zelle
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminiscent
Etheno-NAD	Nikotinamid-1,N6-Etheno-Adenin-Dinukleotid
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward scatter
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
HRP	“Horseradish Peroxidase” (Meerrettich Peroxidase)
Lk	Lymphknoten
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADase	NAD-Glykohydrolase
NC	Nitrozellulose
NICD	“NAD induced cell death” (NAD induzierter Zelltod)
PARB	Poly-ADP-Ribosyltransferase
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PE	Phycoerythrin
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-N-myristat 13-acetat
PMN	Polymorphnukleären neutrophilen Leukozyten
PVDF	Polyvinylendifluorid
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese

SSC	Side scatter
TBS	“Tris-buffered saline”
TOF	“Time of flight”

Anglizismen

Knock-out	Funktionsverlust eines Gens
Gaten, Gate setzen	Eingrenzung einer Zellpopulation bei der FACS-Analyse
Shedding	Abschneiden von Zelloberflächenproteinen
Homing, trafficking	Wanderungsverhalten von Leukozyten im Organismus
Second messenger	intrazelluläres zweites Signal
Rafts	„lipid rafts“: Kompartiment in der Zellmembran, das spezielle Lipide enthält
Priming	Interaktion von naiver T-Zellen mit dendritischer Zelle, die spezifischen Peptid-MHC-Komplex präsentiert

1 Einleitung

Was sind ADP-Ribosyltransferasen (ARTs)? Obwohl diese Enzyme keinen sehr großen Bekanntheitsgrad haben, ist doch fast jeder, der diese Zeilen hier liest, selbst schon mit mindestens einer ADP-Ribosyltransferase in direkten körperlichen Kontakt getreten. Der Impfstoff gegen die gefürchtete Erkrankung Diphtherie enthält nämlich eine ADP-Ribosyltransferase- den Virulenzfaktor des *Corynebacterium diphtheriae* (Erreger der Diphtherie)- das Diphtherietoxin. ARTs sind Enzyme, die NAD⁺ als Substrat verwenden und den Transfer der ADP-Ribose-Gruppe von NAD⁺ auf spezifische Zielsubstanzen (am häufigsten Proteine) unter Freisetzung von Nicotinamid katalysieren ((Koch-Nolte et al., 2001b) (Haag and Koch-Nolte, 1997) (Aktories, 1991)). Häufig beeinflusst die ADP-Ribosylierung eines Zielproteins dabei dessen Funktion. *Was macht das Diphtherietoxin so gefährlich?* Das Diphtherietoxin bewirkt im Zytosol der Zelle durch ADP-Ribosylierung seines Zielproteins Elongationsfaktor 2 dessen Inaktivierung und somit das Zusammenbrechen der Proteinbiosynthese, was den Untergang der Zelle zur Folge hat. Neben den gut untersuchten prokaryotischen ARTs und deren Zielproteinen wurde in den letzten Jahren eine ganze Familie von eukaryotischen ARTs kloniert, über deren Funktion und deren Zielproteine weniger bekannt ist. Unsere Arbeitsgruppe ist dabei vor allem an der Erforschung der Funktion eukaryotischer ARTs im Immunsystem interessiert. So konnte ART2 in der Maus und in der Ratte auf reifen T-Zellen des Immunsystems identifiziert werden und es zeigte sich, dass ARTs Einfluss auf wichtige Prozesse im Immunsystem besitzen. Im folgenden soll eine Einführung in das Immunsystem mit einem Schwerpunkt auf der „immunologischen Synapse“ zwischen dendritischer Zelle und T-Zelle, sowie ein Überblick über die eukaryotischen ARTs und ihre Zielproteine im Immunsystem gegeben werden.

1.1 Das Immunsystem

Zum besseren Verständnis kann man das Immunsystem in spezifische und unspezifische Immunität aufteilen. Die Mechanismen der unspezifischen Immunität sind dabei angeboren (präformiert) und reagieren schnell, wohingegen die spezifische Immunantwort im Verlauf der Auseinandersetzungen mit einem Antigen erworben wird.

1.1.1 Die unspezifische Immunität

Die unspezifische Immunität wird durch humorale und zelluläre Faktoren vermittelt.

1.1.1.1 Die humorale Immunität

Zur humoralen Komponente zählen in Körperflüssigkeiten gelöste Komponenten (lat. humor: Flüssigkeit) wie z.B. das Komplementsystem, welches bei Aktivierung - klassisch durch Immunkomplexe, alternativ durch bakterielle Faktoren - in einer kaskadenartigen Reaktion einen Membranangriffskomplex bildet, um die Zielzelle abzutöten. Des Weiteren zählen protektive Proteine wie z.B. das Bakterienzellwände spaltende Lysozym, Akute-Phase- Proteine wie das C-reaktive Protein und verschiedene Zytokine wie z.B. Interleukin 6 oder TNF- α dazu. Ebenso gehören Chemokine zur unspezifischen humoralen Immunität, die den Entzündungszellen den Weg zum Ort der Entzündung bahnen, und verschiedene Interferone, die z.B. von virusinfizierten Zellen gebildet werden, um der Virusausbreitung entgegenzuwirken.

1.1.1.2 Die zelluläre Immunität

Zur unspezifischen zellulären Immunität gehören Granulozyten, Monozyten und die von Monozyten abgeleiteten Zellen wie Makrophagen und Antigen präsentierenden Zellen (APCs). Granulozyten sind an der Phagozytose von Mikroorganismen im Blut und am Infektort beteiligt. APCs sind z.B. dendritische Zellen, die im Rahmen der T-Zell-Aktivierung eine Schlüsselrolle spielen und somit ein sehr wichtiges bindendes Glied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunität darstellen.

1.1.2 Die spezifische Immunität

Die spezifische Immunität ist im Gegensatz zur unspezifischen Immunität erworben. Sie setzt sich ebenso aus humoraler und zellulärer Immunität zusammen, wobei B-

Zellen mit sezernierten Antikörpern den humoralen Schenkel und T-Zellen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) den zellulären Schenkel der spezifischen Immunantwort übernehmen. T- und B-Zellen stammen von pluripotenten Vorläuferzellen des Knochenmarks ab. Sie machen beide eine so genannte Reifung durch, wobei die T-Zellen diese im Thymus, die B-Zellen diese im Knochenmark durchlaufen. T- und B-Zellen entwickeln während dieser Reifung durch Rekombination ihrer genomischen DNA ein immens großes Repertoire von Immunglobulinen und spezifischen T-Zell-Rezeptoren, wodurch sich die Anpassungsfähigkeit des Immunsystems an die große Zahl unterschiedlicher Antigene erklären lässt.

1.1.2.1 Die B-Zellen

B-Zellen binden mit ihren spezifischen Immunglobulinen vor allem lösliche Antigene. Die Aktivierung der B-Zelle führt zur Proliferation und zur Differenzierung zur Antikörper produzierenden Plasmazelle. An der Aktivierung von B-Zellen sind T-Helfer-Zellen beteiligt. Andererseits können B-Zellen auch als Antigen präsentierende Zellen (APCs) fungieren.

1.1.2.2 Die T-Zell-Reifung und zentrale Toleranz:

Die Reifung beginnt in der äußeren Zone des Thymus, der subkapsulären Region. Von dort finden über den Kortex bis zur Medulla die verschiedenen Phasen der Reifung statt. Die T-Zellen unterlaufen im Thymus den Prozess der so genannten positiven und negativen Selektion. Bei der positiven Selektion überleben nur die T-Zellen, die fähig sind, körpereigene MHC-Moleküle zu erkennen. Im Prozess der negativen Selektion (oder auch klonale Deletion) gehen T-Zellen in Apoptose, die gegen körpereigene auf MHC präsentierte Peptide gerichtet sind. Diese Selektion dient der Vorbeugung von Autoimmunerkrankungen und wird auch als zentrale Toleranz bezeichnet. Die unterschiedlichen Stadien der Reifung können anhand von verschiedenen Oberflächenmarkern (CD44, CD25, CD3-T-Zell-Rezeptorkomplex) charakterisiert werden. Es verlassen nur Lymphozyten den Thymus, die einen funktionellen CD3-T-Zell-Rezeptorkomplex besitzen und einen der Korezeptoren (entweder CD8 oder CD4) auf der Zelloberfläche tragen. Die resultierenden

peripheren naiven CD4 oder CD 8 einzelpositiven T-Lymphozyten haben unterschiedliche Funktionen.

1.1.2.3 Funktion der aktivierten CD 8 positiven T-Zellen

Aktivierete CD8 positive T-Zellen richten ihre zytotoxische Wirkung auf Zellen, die zytosolische Antigene produzieren. Dabei werden Bestandteile von Erregern, die sich im Zytoplasma der Zelle vermehren, wie Viren und bestimmte Bakterien, via MHC-I auf der Zelloberfläche präsentiert. Die auf MHC-I präsentierten Peptidfragmente stammen dabei zum großen Teil aus dem Proteasom, einem Multienzymkomplex mit Proteaseaktivität, der zytosolische Proteine abbaut. Die CD8-Effektorzelle setzen lytische Granula mit zytotoxischen Proteinen wie Perforin und Granzyme frei. Perforin polymerisiert zu Poren in der Membran der Zielzelle. Wahrscheinlich kommt es unter Beteiligung der Granzyme (Serinproteasen), die durch die geschaffenen Poren in die Zielzelle gelangen, zur Apoptose der Zielzelle. Ein zweiter, Perforin-unabhängiger Mechanismus der Zytotoxizität ist die Expression von Fas Ligand, welches auf der Zellmembran aktivierter T-Zellen vorhanden ist. Wird Fas auf der Zielzelle von Fas Ligand gebunden, kommt es durch einen Caspasen-vermittelten Prozess zur Apoptose der Zielzelle. Dieser Mechanismus ist auch entscheidend, um die Vermehrung der Lymphozyten zu stoppen, nachdem die Elimination von Krankheitserregern beendet ist.

1.1.2.4 Funktion der aktivierten CD 4 positiven T-Zellen

Die aktivierten CD4-positiven T-Zellen differenzieren sich in zwei verschiedene Untergruppen, die TH1- und TH2-Zellen. Die Umstände, die zu dieser Differenzierung führen sind nicht voll verstanden, die nachfolgenden Reaktionen der TH1- und TH2-Zellen sind aber grundlegend verschieden. TH-1-Zellen führen zu einer zellulären Immunantwort durch Aktivierung von Makrophagen, sowie zu einer Steigerung der Aktivität von zytotoxischen T-Zellen, TH-2-Zellen führen zu einer humoralen Immunantwort durch Aktivierung von B-Zellen.

Während der Proteinbiosynthese des MHC-II-Komplexes gelangt dieser in das endoplasmatische Retikulum. Dort verhindert die Assoziation mit einem als MHC-II assoziierte invariante Kette li bezeichnetem Protein die Bindung von Peptiden. Die

Beladung der MHC-II-Moleküle mit Peptiden erfolgt erst nach proteolytischer Spaltung von li nach Transport in ein endosomales Kompartiment mit niedrigem pH-Wert. Per Endozytose von Makrophagen aufgenommene Proteine oder internalisierte Antigen-beladende Immunglobuline von B-Zellen gelangen so in das endosomale Kompartiment, wo nach proteolytischer Spaltung eine Beladung des MHC-Komplexes mit Peptid erfolgt. Erreger, die sich im Extrazellularraum vermehren, führen eher zu einer TH2-Antwort, Erreger, die sich in Makrophagen-Vesikeln vermehren, führen eher zu einer TH1-Antwort.

Die Th2-Antwort

Nach Präsentation von Peptidfragmenten eines Antigens auf MHC-II-Molekülen durch spezielle professionelle Antigen präsentierende Zellen (APCs) kommt es zur Aktivierung der CD4 positiven T-Zellen und ihrer Differenzierung zu Th2-Effektor-Zellen. Diese sind darauf spezialisiert, B-Zellen zu aktivieren. Das nach Bindung an den Immunglobulin-Rezeptor von der B-Zelle internalisiertes Antigen wird anschließend auf MHC-II präsentiert. Trifft nun eine für dasselbe Antigen spezifische Th2-Effektor-Zelle auf diese B-Zelle, kommt es zur Aktivierung der B-Zelle durch von der T-Helferzelle ausgeschüttete Zytokine und die Expression von Zelloberflächenproteinen. Die B-Zellen proliferieren stark und einige differenzieren sich zu Antikörper produzierenden Plasmazellen.

Die Th1-Antwort

Die Th1-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Makrophagenaktivierung. Im Gegensatz zur rapiden Effektorreaktion der CD8 positiven T-Zellen, die bereits vorgefertigte Perforine und Granzyme ausschütten, dauert die Reaktion einer Effektor-TH1-Zelle wesentlich länger, da die Zellen ihre Effektor-Zytokine und Zelloberflächenmoleküle erst *de novo* synthetisieren müssen. Sie wird deshalb auch „delayed-type reaction“ genannt. Das bedeutet, dass die Adhäsion der T-Zelle und ihrer Zielzelle länger bestehen bleiben muss. Die neu gebildeten Zytokine werden dann zur Kontaktstelle zwischen der T-Zell-Membran und dem Makrophagen geschleust und dort lokal freigesetzt. Höchstwahrscheinlich wird durch diese lokale Abkapselung nur der Makrophage aktiviert, der gerade der bewaffneten Th1-Zelle

sein Antigen präsentiert und keine weiteren in der Umgebung befindlichen anderen Makrophagen. Wichtigstes aktivierendes Zytokin ist dabei Interferon γ . Die Wirkung von Interferon γ wird durch die Interaktion von CD40-Ligand auf der Th1-Zelle mit CD40 auf dem Makrophagen um ein Vielfaches stärker. Die aktivierten Makrophagen machen eine Reihe von biochemischen Veränderungen durch und können sich danach gegen bestimmte intrazelluläre Erreger wie z.B. Mykobakterien behaupten.

1.1.2.5 Regulatorische T-Zellen (Tregs)

Neben dem oben beschriebenen Mechanismus der zentralen Toleranz existiert die periphere Toleranz, die durch regulatorische T-Zellen kontrolliert wird. Natürlicherweise auftretende regulatorische T-Zellen (Tregs) machen ungefähr 10% der peripheren CD4 positiven Zellen aus und besitzen eine Schlüsselrolle bei der Bildung der peripheren Toleranz. Foxp3, der zur „forhead“ Familie gehörende Transkriptionsfaktor ist für die Entwicklung und Funktion von Tregs essentiell. Mutationen im Foxp3-Gen verursachen ein schweres Autoimmunsyndrom in Menschen und Mäusen durch fehlende CD25+CD4+ Tregs. Die Mechanismen, die zur Suppression anderer T-Zellen führen, sind zum größten Teil noch ungeklärt, umfassen jedoch die Sekretion von TGF- β und IL-10, sowie direkte Zell-Zell-Interaktionen.

1.1.2.6 Die T-Zellaktivierung

Naive T-Zellen wandern aus der Blutbahn in die Lymphknoten ein, indem sie an Venolen mit hohem Endothel (HEV: „high endothelial venules“) binden. Vermittelt wird dieser als „homing“ bezeichnete Prozess durch Adhäsionsproteine wie z.B. L-Selektin (CD62L) auf T-Lymphozyten, welches an Kohlenhydratstrukturen auf verschiedenen Proteinen wie z.B. CD34 oder GlyCAM-1 auf der Endothelzelle bindet. Dendritische Zellen phagozytieren Antigene in der Peripherie und wandern in genau die Zone des Lymphknotens ein, die naive T-Zellen beim Homing passieren. Dort kommt es zu der entscheidenden Interaktion, die zur Bildung von aktivierten T-Zellen (Effektor-T-Zellen) führt.

Im Folgenden soll auf die T-Zell-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion, die zu dieser Aktivierung führt, näher eingegangen werden.

Der TCR besteht aus der TCR α - und TCR β -Kette, die die Antigenbindungsstelle bilden. Akzessorisch mit dem TCR verbunden sind sechs invariante Proteinketten, die als CD3-Komplex bezeichnet werden: eine CD3 γ -, eine CD3 δ -Kette, zwei CD3 ϵ - und zwei CD3 ζ -Ketten (Abb.1). Im zytoplasmatischen Teil der CD3-Ketten findet sich die bekannte ITAM-Sequenz („immunoreceptor tyrosine based activation motifs“), die aus zwei in einem spezifischem Abstand zueinander gelegene Tyrosinresten besteht. Das erste intrazelluläre Signal nach TCR-Aktivierung ist die Phosphorylierung dieser ITAMs. Die Phosphorylierung wird durch spezifische Tyrosinkinasen erreicht.

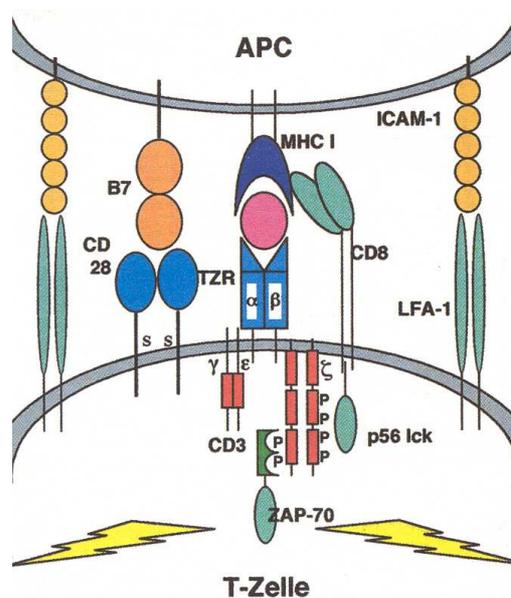


Abbildung 1: Signaltransduktion in T-Zellen (aus (Haag F. 1998))

Maßgeblich daran beteiligt sind die Src-Kinasen Lck und Fyn, die durch unterschiedliche Mechanismen in den Bereich des TCRs rekrutiert werden. Ein entscheidender Schritt der weiteren Signaltransduktion ist die Bindung eines als

ZAP-70 bezeichneten Proteins („zeta associated protein-70“) an die phosphorylierten ITAMs von CD3- ζ . Das durch Lck aktivierte ZAP70 aktiviert durch Phosphorylierung weitere Adapterproteine wie LAT („linker of activation in T cells“) und SLP76 („SRC homology 2 (SH2)-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa“). Zusammen mit LAT werden „lipid rafts“ (Rafts: s.u.) in den Bereich der Signaltransduktion rekrutiert, die durch Bündelung von aktivierenden Proteinen wie ein Signalverstärker wirken (siehe unten). TEC-Kinasen binden mittels einer PH-Domäne („pleckstrin homology domain“) an spezielle phosphorylierte Lipide der Rafts, via SH2-Domänen an ITAMs und via SH3-Domänen an Prolin reiche Proteine, wodurch es zu einer Zunahme der involvierten Proteine und damit zu einer Verstärkung des Signals kommt. Durch Phosphorylierung aktivierte TEC-Kinasen aktivieren das Enzym Phospholipase C γ (PLC γ), welches das Membranphospholipid Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. Der „second messenger“ IP₃ rekrutiert Ca²⁺ ins Zytosol, woraufhin unter Mitwirkung des Ca²⁺-bindende Protein Calmodulin der Transkriptionsfaktors NFAT („nuclear factor of activated T cells“) aktiviert wird, der an die Promotorregion des IL-2-Gens bindet und dessen Transkriptionsaktivierung einleitet. ADP-Ribosylierung von T-Zelloberflächenproteinen führte zu einer Hemmung von Proliferation und Zytotoxizität nach T-Zellaktivierung (siehe unten). Ziel dieser Arbeit war es, den molekularen Mechanismen dieser Effekte nachzugehen. Dazu wurden Interaktionen von Zielproteinen von Tyrosinkinasen und ARTs untersucht, die an der oben dargestellten Signaltransduktionskaskade beteiligt sein könnten.

1.1.2.7 Die Schlüsselrolle der dendritischen Zellen

Neben dem Signalweg, der über den TCR eingeleitet wird und auch als erstes Signal bezeichnet wird, werden weitere die T-Zell-Aktivierung unterstützende Moleküle für eine effektive Aktivierung benötigt. Dieses auch als zweites oder kostimulierendes Signal bezeichnete Signal wird durch Antigen präsentierende Zellen (APCs) vermittelt. Als APCs können dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen fungieren, wobei die dendritischen Zellen die potentesten APCs für die Initiation einer Immunantwort darstellen.

Dendritische Zellen wandern als unreife Zellen vom Blut in die peripheren Organe ein, wo sie Antigene phagozytieren, um von dort mit der Lymphe in die drainierenden Lymphknoten zu gelangen. In diesem Zustand sind die dendritischen Zellen optimal auf die Antigenaufnahme eingestellt. Diese erfolgt dabei durch Makropinozytose, Endozytoserezeptoren wie z.B. den Makrophagen-Mannose-Rezeptor, DEC 205 oder Fc-Rezeptoren (Abb. 2).

Um das zweite Signal übermitteln zu können, müssen die dendritischen Zellen einen Reifungsprozess durchmachen. Die stärksten Stimuli, die die Reifung der dendritischen Zellen veranlassen, sind direkte Wechselwirkungen mit Krankheitserregern, z.B. mit lebenden grampositiven Bakterien, LPS als Bestandteil von Zellwänden gramnegativer Bakterien, CpG-Oligonucleotide, Zytokine wie TNF- α , IL-1 ((Sallusto et al., 1995) (Rescigno et al., 1998) (Cella et al., 1999)). Durch diese Faktoren kommt es zur Expression kostimulatorischer Moleküle, sowie zur verstärkten Synthese von MHC- und Adhäsionsmolekülen (Abb.2). In diesem Phänotyp sind die dendritischen Zellen dann nicht mehr in der Lage, Antigene zu phagozytieren.

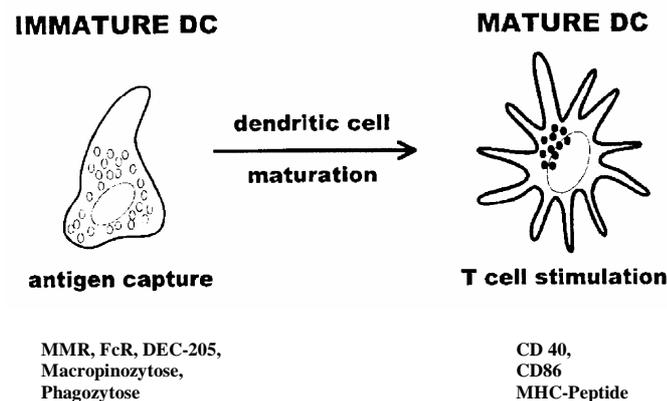


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Reifung dendritischer Zellen

(aus (Steinman, 2001)) Unreife DCs sind sehr endozytoseaktiv. Sie besitzen adsorptive Rezeptoren wie MMR, FcR und DEC-205. Reife DCs besitzen eine Reihe von T-Zell-Interaktionsmolekülen wie CD40 und CD86 und eine große Anzahl von MHC-Peptiden, um T-Zellen optimal stimulieren zu können.

Die am besten charakterisierten kostimulatorischen Moleküle sind B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die an den Rezeptor CD28 auf naiven T-Zellen binden. Auch bei der Stimulation von CD8 positiven naiven T-Zellen scheint den dendritischen Zellen eine Schlüsselrolle zuzukommen, wobei ein als „cross presentation“ bezeichneter Prozess eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Dabei werden extrazelluläre Antigene wie z.B. apoptotische Zellen phagozytiert und auf MHC-I präsentiert ((Albert et al., 1998a) (Albert et al., 1998b) (Regnault et al., 1999) (Rodriguez et al., 1999)). Die wichtigste Funktion des kostimulatorischen Signals ist es, die Synthese von IL-2 zu induzieren, wodurch es zur Proliferation der T-Zellen kommt. Wahrscheinlich wird dies durch Stabilisierung der IL-2-mRNA und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB erreicht.

Da von der Induktion kostimulatorischer Signale letztendlich auch die adaptive Immunreaktion abhängt, kommt der Aktivierung der APCs eine entscheidende Rolle im Immunsystem zu. Neben dem „erweiterten Selbst-Fremd-Modell“ von Janeway, was eine während der Evolution erhalten gebliebene Fähigkeit der natürlichen Immunität, infektiöse Agentien mittels „pattern recognition receptors“ zu erkennen, fordert, wurde das „danger model“ postuliert, indem die Aktivierung der APC durch aus nekrotischen Zellen freigesetzten Gefahrensignale postuliert wurde (Matzinger, 1998).

Genauso wie intrazellulären posttranslationalen Modifikationen eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion zukommt, könnten auch extrazelluläre posttranslationale Modifikationen wie z.B. ADP-Ribosylierung Auswirkungen auf die Signaltransduktion haben und z.B. an einer Immunantwort auf „Gefahr“ beteiligt sein.

1.1.2.8 Der Endozytoserezeptor DEC-205

Auf die Rolle des Endozytoserezeptors DEC-205 soll hier genauer eingegangen werden, da er als Zielprotein der ARTs identifiziert werden konnte.

DEC-205 ist ein 205-kD großer Multilektinrezeptor, vom transmembranen Typ-I, der in die Familie der Makrophagen-Mannose-Rezeptoren (MMRs) einzuordnen ist (Jiang et al., 1995). Maus DEC-205 wird am stärksten auf dendritischen Zellen und kortikalen Thymus-Epithel-Zellen exprimiert, in geringerem Maße jedoch auch auf T-, B-, NK-Zellen und anderen epithelialen Zellen (Witmer-Pack et al., 1995). DEC-205 besteht N-terminal aus einer Cystein-reichen Domäne, einer Fibronectin-Typ-II-Domäne, sowie zehn externen C-Typ Lektin- ähnlichen Domänen. Im Gegensatz zum MMR konnten jedoch bisher kein funktioneller Ligand für DEC205 identifiziert werden. Die zellbiologischen Gemeinsamkeiten von MMR und DEC-205 lassen jedoch eine Funktion von DEC-205 als einen professionellen Antigenaufnahme-rezeptor wahrscheinlich erscheinen.

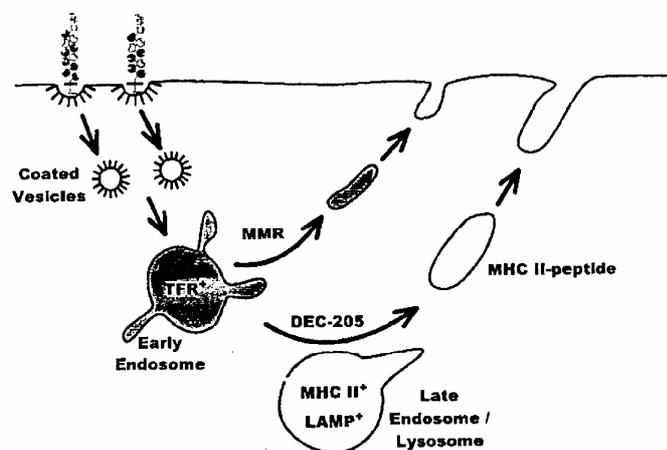


Abbildung 3: Schematische Darstellung des „Recycling-Zyklus“ von MMR und DEC-205. Der zytosolische Teil des MMR, der mit der externen Domäne vom humanen CD16-Fc-Rezeptor verbunden wurde, recycelt mittels früher Endosomen. DEC-205 hingegen recycelt mittels später Endosomen oder Lysosomen, die durch LAMP (Lysosome-associated-membrane proteins) markierbar sind. Vermutlich durch die große Zahl von MHC-Klasse-II-Rezeptoren führt dies zu einer starken Effizienzsteigerung der Antigen Präsentation durch DEC-205. TFR+= Transferrin Rezeptor. (aus (Steinman, 2001))

Beide werden durch „coated pits“ aufgenommen, fusionieren mit Endosomen und gelangen in einem auch als Recycling bezeichneten Vorgang an die Zelloberfläche zurück (siehe Abb3). DEC-205 zirkulierte dabei in späten besonders MHC-Klasse-II-reichen Endosomen, im Gegensatz zum MMR, der sich in frühe Endosomen lokalisieren ließ (Mahnke et al., 2000). Antigenpräsentation und Antigenprozessierung von DEC-205 gegenüber CD4 positiven T-Zellen zeigte eine um den Faktor 100 stärkere Reaktion im Vergleich zum MMR (Mahnke et al., 2000). Hinweise sprechen dafür, dass DEC-205 auch an der Präsentation exogener Antigene auf MHC-I beteiligt sein könnte (Bonifaz et al., 2004), so dass eine Antigenapplikation via DEC-205 in unreife DCs sowohl eine CD4 als auch eine CD8 Antwort auslösen könnte. Mit Antigenen gekoppelte DEC-205-Antikörper zeigten im Mausmodell und in humanen in vitro Versuchen erfolgversprechende Ergebnisse für das „antigen-targeting“ in dendritische Zellen: so z.B. im Kontext von HIV-Virus-clearance (Bozzacco et al., 2007), oder bei der Tumorummunisierung ((Mahnke et al., 2005; Trumpfheller et al., 2006)). Diese DEC-205-vermittelte erfolgreiche Immunisierungsstrategie unterstreicht die potentiell wichtige klinische Bedeutung von DEC-205.

1.1.2.7 Immunologische Synapsen

In Analogie zur neuronalen Synapse wird in der Immunologie die Kontaktstelle zwischen APC und T-Zelle, an der Informationen weitergeleitet werden, als „immunologische Synapse“ bezeichnet. Im Gegensatz zu der neuronalen Synapse, in der durch desmosomale, zytoskelettale Verbindungen Verankerungen an der Basalmembran durch extrazelluläre Strukturproteine für Jahre stabilisiert werden können, kommt es zwischen Zellen des Immunsystems zu kurzlebigen Interaktionen durch Adhäsionsproteine ohne Beteiligung von Strukturproteinen, die für Minuten bis Stunden andauern.

Als die klassische immunologische Synapse wurde die Interaktion zwischen naiver T-Zelle und APC beschrieben. Dabei kommt es zu einer Aggregation von spezifischen Proteinen hin auf eine Kontaktstelle, die in mehreren Stadien abläuft (Abb.4). In dem auch als unreife immunologische Synapse bezeichneten Stadium kommt es zu einer Aggregation der Adhäsionsmoleküle LFA-1-ICAM-1 im Zentrum

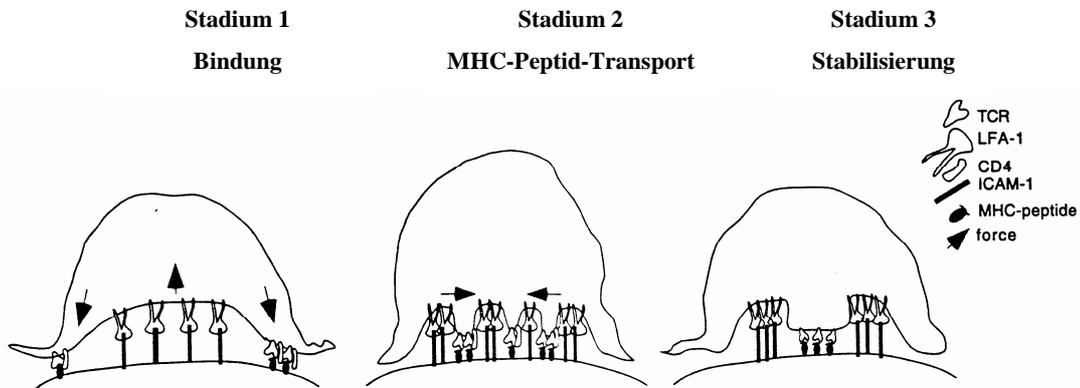


Abbildung 4: Modell zur Bildung der immunologischen Synapse: Seitenansicht auf eine T-Zelle, die eine Synapse mit einer APC bildet. Stadium 1: Bindung: LFA-1 bindet im Zentrum der sich entwickelnden immunologischen Synapse. Die außerhalb davon stattfindende erste Interaktion zwischen TCR und MHC-Peptid-Komplex führt zu frühen Signalen, die die Migration der DC beenden. Stadium 2: MHC-Peptid-Transport: Dauer dieser Phase ca. 5 Minuten. Phase 3: Stabilisierung: es bildet sich ein äußerer LFA-1 enthaltender konzentrischer Ring (p-SMAC), der den zentralen TCR/CD4 enthaltenden Bereich der immunologischen Synapse umschließt (aus (Grakoui et al., 1999)).

der immunologischen Synapse, umgeben von einem Ring von TCR-Peptid-MHC-Molekülen. In dem auch als reife immunologische Synapse bezeichneten Stadium kehrt sich dies um, und man unterscheidet einen „central supramolecular activation cluster“ (c-SMAC), welcher den TCR-Peptid-MHC-Komplex enthält, von einem „peripheral supramolecular activation cluster“ (p-SMAC), welcher einen Ring von Integrinen wie LFA-1 und ICAM-1 enthält (Monks et al., 1998). Während der Bildung der immunologischen Synapse kommt es zu Veränderungen im Zytoskelett, die Zelle polarisiert ihr Aktin und ihre Mikrotubuli auf die Kontaktstelle hin. Die Quervernetzung (clustering) von Rafts ist ein weiterer essentieller Bestandteil bei der Bildung der immunologischen Synapse (Janes et al., 2000) und wird im folgenden Abschnitt behandelt.

Auch zwischen den T-Effektor-Zellen und ihren Zielzellen bilden sich immunologische Synapsen aus, wobei es z.B. bei der zytotoxischen T-Zelle zu einer in die Kontaktstelle gerichteten Sekretion von Effektorzytokinen kommt, die

sicherstellen, dass die Induktion der Apoptose nur auf diese Zielzelle begrenzt bleibt (siehe unten).

Beobachtungen von aggregierten Proteinen bei der Kontaktaufnahme von NK-Zellen (Davis et al., 1999) und B-Zellen (Batista et al., 2001) führten dazu, dass das Konzept der immunologischen Synapse auf andere Effektorzellen ausgedehnt wurde. So wurde auch eine Synapse zwischen APCs und B-Zellen beschrieben (Batista et al., 2001). APCs binden dabei native Antigene auf ihrer Zelloberfläche z.B. durch an Fc-Rezeptoren gebundene Immunglobuline und präsentieren sie B-Zellen, die für dieses Antigen spezifisch sind. Zwischen der APC und der B-Zelle bildet sich dabei eine B-Zell-Synapse. Es kommt zur Polarisierung der Immunglobuline, zum Ausschluss negativer Regulatoren wie CD45, und zur Stimulation der Aktinpolymerisation. Anschließend kommt es zur Internalisierung des Immunglobulinrezeptor-Antigen-Komplexes und zur Prozessierung des Antigens in der B-Zelle. Die prozessierten Peptidfragmente werden auf MHC-II-Molekülen CD4 positiven T-Zellen präsentiert, und es bildet sich die schon beschriebene T-Zell-Synapse. Das Antigen wird quasi „wie ein Staffelstab“ von einer Zelle zur nächsten weitergereicht. Bedeutsam ist, dass dabei ein Weg vorliegt, bei dem B-Zellen membranassoziierte Antigene internalisieren können, die *in vivo* höchstwahrscheinlich einen großen Teil der Antigene ausmachen, z.B. gebunden an Fc- oder Komplementrezeptoren. Es gibt Hinweise dafür, dass sogar der Transfer von Proteinen interzellulär von der Zielzelle zur Effektorzelle möglich ist (Hudrisier and Bongrand, 2002).

Eine Arbeitshypothese dieser Arbeit war es, dass an der immunologischen Synapse beteiligte Proteine ADP-ribosyliert werden und dadurch die Inhibierung von T-Zell-Funktionen zu erklären sind.

1.1.2.9 Das Raft-Modell

„Lipid rafts“ bilden von der Lipiddoppelschicht der Zellmembran getrennte, eigenständige Komplexe (engl. rafts: „Flöße“), die spezielle Lipide, wie z.B. Glykosphingolipide, Cholesterin und Glykolipide enthalten, und dabei ein eigenes Kompartiment innerhalb der Plasmamembran bilden, in das nur bestimmte Proteine integriert sind ((Brown and London, 1998) (Schroeder et al., 1994)). In den Rafts konnten viele für die Signaltransduktion wichtige Proteine lokalisiert werden: z.B. die Src-Kinase Lck, das Adapterprotein LAT, der Korezeptor CD4/CD8 und der TCR selbst ((Simons and Ikonen, 1997) (Rietveld and Simons, 1998)).

Ein Hypothese für die Rolle von Rafts bei der Signaltransduktion der T-Zellaktivierung besteht darin, dass wichtige Aktivatoren konzentriert und Inhibitoren wie z.B. CD 45 ausgeschlossen werden. Die für die frühe Phase der interzellulären Kommunikation wichtigen Proteine sind somit größtenteils bereits auf der Zelloberfläche vorhanden und werden mit der Raft-Aggregation zum Ort der Signaltransduktion gebracht (siehe Abb. 5).

Eine klassischerweise mit den Rafts assoziierte Proteingruppe sind GPI-verankerte Protein. So wurden schon vor Jahren Komplexe zwischen GPI-verankerten Proteinen extrazellulär und Src-Kinasen intrazellulär beschrieben, die mit klassischen Lipid-auflösenden Detergenzien nicht in Lösung gingen (Stefanova et al., 1991). Dass Rafts eine Rolle bei der Signaltransduktion spielen könnten, zeigte die Tatsache, dass durch Quervernetzung von GPI-verankerten Proteinen oder Glykolipiden intrazelluläre Signale detektiert werden konnten ((van den Berg et al., 1995).

Auch auf dendritischen Zellen konnte der MHC-II-Komplex in Rafts lokalisiert werden (Anderson et al., 2000), so dass es denkbar erscheint, das Raft-Modell auf beide Seiten der immunologischen Synapse (T-Zelle und APC) auszudehnen.

Die Untersuchung von ART-Zielproteinen innerhalb der Rafts erscheint im Hinblick auf die wichtige Funktion der Rafts bei der T-Zellaktivierung sehr interessant und könnte in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

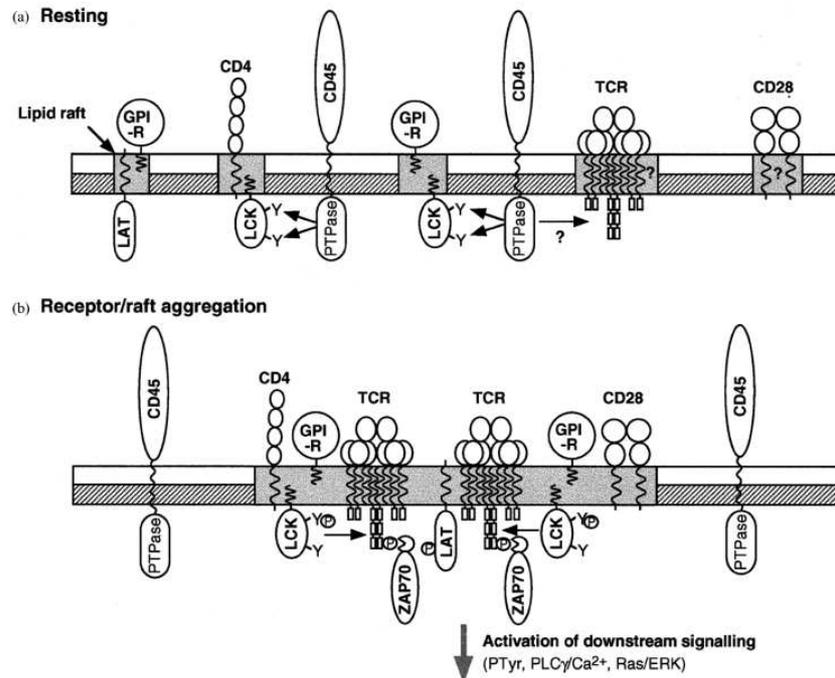


Abbildung 5: Schematische Darstellung der „lipid rafts“ in T-Zellen aus: (Janes et al., 2000)

1.1.2.10 Beteiligung von Neuropilin-1 an der immunologischen Synapse

Auf Neuropilin-1 soll hier näher eingegangen werden, da es als Zielprotein der ARTs identifiziert werden konnte. Neuropilin-1 ist ein Typ-I-Membranprotein, das auf Neuronen als Rezeptor für Semaphorine der Klasse III dient und am gerichteten Wachstum von Axonen beteiligt ist ((He and Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997)). Zusätzlich kann Neuropilin-1 als Rezeptor für den Wachstumsfaktor VEGF („vascular endothelial growth factor“) fungieren und ist an der Angiogenese beteiligt. 2002 wurde Neuropilin-1 als wichtiger Bestandteil der immunologischen Synapse beschrieben (Tordjman et al., 2002). Dabei wurde die Expression von Neuropilin-1 auf humanen dendritischen Zellen und ruhenden T-Zellen nachweisen (Tordjman et al., 2002). Beschrieben wurde dabei eine Kolokalisation von Neuropilin-1 und CD3

auf ruhenden T-Zellen, sowie eine Neuropilin-1-Neuropilin-1-Interaktion zwischen T-Zelle und dendritischer Zelle. Die Tatsache, dass sich die durch dendritische Zellen induzierte Proliferation ruhender T-Zellen durch Inkubation von dendritischen Zellen oder naiven T-Zellen mit anti-Neuropilin-Antikörper inhibieren lässt, scheint Neuropilin-1 eine wichtige Rolle in der Initiierung der primären Immunantwort zukommen zu lassen (Tordjman et al., 2002). Ob Neuropilin-1 über diese Zellinteraktion hinaus an der Signaltransduktion beteiligt ist, ist bisher nicht bekannt.

1.2 ADP-Ribosylierung

ADP-Ribosylierung ist eine posttranslationale Modifikation, bei der die ADP-Ribosegruppe von $\beta\text{-NAD}^+$ unter Freisetzung von Nicotinamid auf spezifische Zielsubstrate übertragen wird ((Ablamunits et al., 2001; Aktories, 1991; Haag and Koch-Nolte, 1997; Jacobson and Jacobson, 1989)(Abb.6)). Neben den in dieser Arbeit untersuchten Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) existieren Poly-ADP-Ribosyltransferasen (PARPs), die als nukleäre Proteine an DNA-Reparatur, Zelldifferenzierung und dem Erhalt der Chromatin-Struktur beteiligt sind (de Murcia et al., 1994). Innerhalb der Mono-ADP-Ribosyltransferasen ist bisher die Protein-ADP-Ribosylierung am besten untersucht, wobei diese häufig zur Inaktivierung des Zielproteins führt ((Ablamunits et al., 2001; Adriouch et al., 2001; Ludden, 1994)).

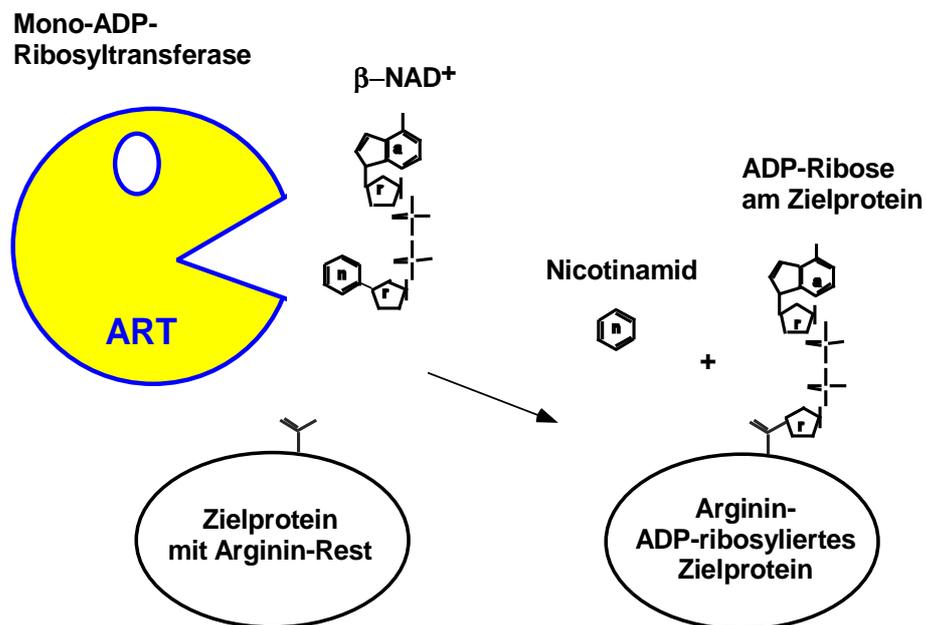


Abbildung 6: Schematische Darstellung der ADP-Ribosylierungsreaktion

ADP-Ribose wird unter Freisetzung von Nikotinamid auf den Arginin-Rest eines Zielproteins übertragen. Die ADP-Ribosyltransferase wird auf Grund ihrer 3D-Struktur als Pacman dargestellt.

Die ADP-Ribosylierung von Zielproteinen ist für unterschiedliche ARTs an unterschiedlichen Aminosäuren möglich z.B. Arginin, Cystein, Asparagin, Glutamin, Diphthamid (ein modifiziertes Histidin) und Lysin (Haag and Koch-Nolte, 1997).

Einige ARTs sind auch in der Lage, freie Aminosäuren oder H₂O als Akzeptor für ADP-Ribose zu verwenden. Die Hydrolyse von NAD⁺ zu Nicotinamid und nicht gebundener ADP-Ribose wird als NAD-Glykohydrolase- oder auch NADase-Reaktion bezeichnet ((Haag and Koch-Nolte, 1998; Koch-Nolte et al., 2000; Koch-Nolte et al., 2001b)). Diese Hydrolyseaktivität findet sich ebenfalls bei anderen NAD spezifischen Ekto-Enzymen wie CD38 und CD157 (Ortolan et al., 2002). ADP-Ribosylierung kann in Gegenwart hoher Konzentrationen von ADP-Ribose auch nicht-enzymatisch erfolgen. Dabei erfolgt die Übertragung von ADP-Ribose auf Amino-, Thiol- oder Hydroxygruppen von Seitenketten ((McDonald and Moss, 1994) (Cervantes-Laurean et al., 1995)). Diese nicht spezifischen Modifikationen erfolgen langsam und benötigen hohe ADP-Ribose-Konzentrationen. In den Versuchen in dieser Arbeit wurde daher, um solche unspezifischen Effekte auszuschließen, zusätzlich zu dem jeweiligen markierten NAD (etheno-NAD oder ³²P-NAD) ADP-Ribose beigefügt.

Proteine sind nicht die einzigen Substrate von ARTs. So wurde z.B. eine RNA-ADP-Ribosylierung beschrieben (Spinelli et al., 1999), sowie die ADP-Ribosylierung von DNA durch Pierisin, einer Toxin-ähnlichen ART einer bestimmten Schmetterlingsart, und die ADP-Ribosylierung des Antibiotikums Rifampin durch eine mykobakterielle ART, als neuer Mechanismus einer Antibiotikaresistenz ((Koch-Nolte et al., 2001a; Koch-Nolte et al., 2001b; Quan et al., 1999)).

Interessanterweise findet sich im Genom von Hefe, Wurm, Fliege oder Pflanze kein vorhergesagtes offenes Leseraster („open reading frame“) mit Sequenzähnlichkeit zu den Säugetier-ARTs oder zu den bakteriellen ARTs (Glowacki et al., 2002). Diese phylogenetische Lücke deutet darauf hin, dass die ARTs durch horizontalen Gentransfer in das Genom der Säugetiere hineingekommen sein könnten.

1.2.1 Bakterielle ADP-Ribosyltransferasen und ihre Zielproteine

Zytotoxizität durch Protein-ADP-Ribosylierung ist der pathogenetische Mechanismus einer Reihe bakterieller Toxine, die lebensgefährliche Erkrankungen auslösen (z.B. *C. diphtheriae*, *V. cholerae*, *E. coli*, *B. pertussis*, *S. entericae*, *C. botulinum*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*) (Aktories and Just, 2000; Domenighini and Rappuoli, 1996; Otto et al., 2000)). Die bakteriellen ARTs gelangen dabei durch verschiedene Mechanismen in die Zelle und unterbinden wichtige Funktionen durch ADP-Ribosylierung von Schlüsselenzymen. Die katalytische Untereinheit des Diphtherietoxins ADP-ribosyliert z.B. im Zytosol der Wirtszelle den Elongationsfaktor 2 an einem Diphthamid-Rest, wodurch es zum Erliegen der Proteinbiosynthese kommt. Das Cholera-toxin beeinflusst die Signaltransduktion, indem es spezifisch Arginin-Reste an der Alpha-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins ADP-ribosyliert, wodurch das Enzym Adenylatcyclase permanent aktiviert wird (Moss and Vaughan, 1988). Als weitere Beispiele seien Salmonella enterica Toxin (SpvB) und das C2-Toxin von C. Botulinum genannt, wobei in beiden Fällen Aktin ADP-ribosyliert wird ((Tezcan-Merdol et al., 2001) (Aktories, 1994)). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über prokaryotische und eukaryotische ARTs und ihre Zielproteine.

Enzym	„target“	Effekt
Prokaryotische Enzyme:		
<i>Diphtherie-Toxin</i>	EF-2	Inhibierung der Protein-Synthese
<i>Pseudomonas Exotoxin A</i>	unbekannt	unbekannt
<i>Cholera Toxin</i>	G α_s , G α_t	Inhibierung der GTPase-Aktivität
<i>Escherichia coli Toxin (LT1 und LT2)</i>	unbekannt	unbekannt
<i>Pertussis Toxin</i>	G α_i , G α_o , G α_t	Entkopplung von Rezeptor und G-Protein
<i>Salmonella enterica Toxin (SpvB)</i>	Aktin	Inhibierung der Aktin-Polymerisation
<i>C. botulinum Toxin (C2)</i> <i>Bacillus cereus Toxin (VIP2)</i>	unbekannt	unbekannt
<i>Pseudomonas Exotoxin S</i>	Ras	Auseinanderbrechen des Zytoskeletts
<i>C. Botulinum Exotoxine (C3)</i> <i>C. limosum Exotoxin (C3-ähnlich)</i> <i>S. aureus Exoenzym (C3stau)</i> <i>Bacillus cereus Exoenzym (C3cer)</i>	Rho, Rac	Auseinanderbrechen des Zytoskeletts und Golgi-Apparat
<i>Mycobacterium smegmatis mono(ADP-ribosyl)-Transferase</i>	Rifampicin	Antibiotikainaktivierung
<i>Rhodospirillum rubrum (DRAT)</i>	Dinitrogenase Reduktase	Inhibierung der Enzymaktivität
<i>E. Coli Teven Phagen Toxin (ALT, MOD)</i>	RNA-Polymerase	Inhibierung der Transkription
<i>Bacillus sphaericus Toxin (MTX)</i>	EF-Tu und andere	Inhibierung der Protein-Synthese
Eukaryotische Ektoenzyme:		
ART1	Integrin α_7 , Defensin HNP-1, FGF-2, PDGF-BB	Inhibierung von Zielfunktionen
ART2.1 und ART2.2	LFA-1, CD8, CD27, CD43, CD44, CD45, P2X7	Inhibierung von Lymphozyten-Funktionen und Induktion von Apoptose
ART3	unbekannt	unbekannt
ART4	unbekannt	unbekannt
ART5	unbekannt	unbekannt
ART6.1 und ART6.2	Aktin	Inhibierung von Zielfunktion
ART7	unbekannt	unbekannt
<i>P. rapae Toxin, Pierisin</i>	DNA	Induktion von Apoptose

Tabelle 1: Übersicht über prokaryotische und eukaryotische ARTs und ihre Zielproteine (Seman et al., 2004)

1.2.2 Eukaryotische ADP-Ribosyltransferasen

Alle bisher bekannten eukaryotischen ARTs sind extrazelluläre Proteine mit einer molekularen Größe von ca. 30-40 kDa, die transmembran verankert sind oder sezerniert werden. Die Bindung an die Zellmembran erfolgt meist mit einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker.

Die erste eukaryotische Mono-ADP-Ribosyltransferase, heute als ART1 bezeichnet, wurde aus dem Skelettmuskel des Kaninchens kloniert (Zolkiewska et al., 1992). Auch auf den murinen Lymphomzelllinien SL12 (Yu et al., 1997) und Yac-1 (Okazaki et al., 1996) ließ sich ART1 identifizieren. ART-Aktivität, die vermutlich ART1 zuzuschreiben ist, wurde in Membranpräparationen von Herzmuskelzellen von Ratte, Maus, Wachtel, Hund und Kaninchen (McMahon et al., 1993), sowie auf humanen polymorphnukleären neutrophilen Leukozyten (PMNs) ((Allport et al., 1996) (Donnelly et al., 1996)) und humanen Epithelzellen des Respirationstraktes nachgewiesen ((Paone et al., 2002) (Balducci et al., 1999)).

ART2 konnte initial auf Lymphozyten der Ratte identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass ART2 dem schon länger bekannten Lymphozytendifferenzierungsmarker RT6 entsprach ((Haag et al., 1995) (Haag and Koch-Nolte, 1997)). Auch in der Maus konnte ART2 nachgewiesen werden, wohingegen ART2 beim Menschen nur als Pseudogen vorliegt. ART2-Expression außerhalb des Immunsystems ist bisher nicht bekannt. Das Maus ART2 umfasst zwei eng verwandte Gene ART2.1 und ART2.2, wovon drei Haplotypen bekannt sind ((Koch et al., 1990) (Prochazka et al., 1991) (Hollmann et al., 1996)). Verschiedene Maus-Stämme unterscheiden sich in ihrem Gebrauch der zwei Loci innerhalb verschiedener lymphatischer Gewebe. ART2.1 wird in dem Maus-Stamm NZW exprimiert, wobei das Gen für ART2.2 fehlt. ART2.2 wird in dem Mausstamm C57BL/6 exprimiert, wobei das Gen für mART2.1 inaktiviert vorliegt. Beide ARTs werden gleichermaßen in den Mausstämmen Balb/c und B6NWF exprimiert ((Prochazka et al., 1991) (Hollmann, 1996 #74)). Das Ratten-ART2 besitzt eine starke NADase-Aktivität, ist jedoch nicht in der Lage, andere Zelloberflächenproteine zu modifizieren. Ratten-ART2.2 besitzt im Gegensatz zu Ratten-ART2.1 eine Auto-ADP-Ribosyltransferaseaktivität {Haag 1995, Karsten, 1997 #3}. Interessanterweise finden sich ART2 und ART1

vorzugsweise auf differenzierten Zellen. So findet sich ART2 nur auf ausgereiften peripheren T-Zellen, und ART1 nur auf ausgereiften Myotubuli (Zolkiewska and Moss, 1993).

1997 konnten zwei weitere neue Mitglieder der ARTs im menschlichen Genom identifiziert und kloniert werden, benannt ART3 und ART4 (Haag and Koch-Nolte, 1997). Dabei handelt es sich ebenfalls um GPI-verankerte ARTs. ART3 zeigte in Northernblot-Analysen im Hodengewebe die stärksten Signale, konnte daneben aber ebenfalls im Skelettmuskel, Herzmuskel und in humanen Atemwegszellen, sowie auf durch LPS aktivierten Makrophagen (Grahner et al., 2002) nachgewiesen werden. ART4 entspricht dem aus der Bluttransfusion bekannten Dombrock-Antigen auf Erythrozyten (Gubin et al., 2000). ART3 und ART4 zeigen im Bereich ihres aktiven Zentrums keine typische Konsensussequenz für Arginin-spezifische ARTs. Welche Rolle ART3 und ART4 nach Verlust der ursprünglichen Enzymaktivität zukommt, ist unklar. Neben der Expression von ART4 auf Erythrozyten, konnte es in niedrigeren Konzentrationen auf Endothelzellen, Monozyten und auf der Leukämie-Zelllinie KU-812 (Parusel et al., 2005), sowie auf humanen Atemwegszellen (Balducci et al., 1999) und auf durch LPS aktivierten Makrophagen (Grahner et al., 2002) nachgewiesen werden.

1996 wurde ART5 kloniert (Okazaki and Moss, 1996). ART5 ist eine sezernierte ART und wird am stärksten im Hoden und nur weniger stark in Skelett- und Herzmuskel exprimiert. Wie Ratten-ART2 besitzt Maus-ART5 eine starke NADase-Aktivität, und nur eine schwache ADP-Ribosylierungspotenz von Fremdproteinen (Glowacki et al., 2002). Interessanterweise scheint die Auto-ADP-Ribosylierung von Maus ART5 die Transferaseaktivität *in vitro* zu steigern (Weng et al., 1999). Das humane ART5 hingegen entspricht in seiner Enzymaktivität eher dem Maus-ART2.1 und -ART2.2. Neben der Auto-ADP-Ribosylierung werden vor allem andere Zelloberflächenproteine modifiziert bei nur schwacher NADase-Aktivität ((Karsten et al., 1997) (Glowacki et al., 2001) (Okazaki et al., 1996)).

Aus Knochenmarkszellen vom Huhn konnten 1994 ART6.1 und ART6.2 kloniert werden (Tsuchiya et al., 1994). Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um sezernierte Formen (Tsuchiya et al., 1994). Des Weiteren wurde ART6.1 in Granula

von PMNs gefunden ((Mishima et al., 1991) (Terashima et al., 1996)). Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen eukaryotischen ADP-Ribosyltransferasen.

ART	Expressionsprofil
ART1	Skelettmuskulatur, Herzmuskel, Lunge, Neutrophile Granulozyten, Lymphoma-Zelllinien
ART2	Reife T-Zellen
ART3	Hoden, Herzmuskel, Skelettmuskel, Lunge, Monozyten
ART4	Erythrozyten, Hämatopoetische Zellen, Herzmuskel, Skelettmuskel, Lunge, Monozyten
ART5	Hoden, Herzmuskel, Skelettmuskulatur, Lymphoma-Zelllinien

Tabelle 2: Übersicht über das Expressionsprofil eukaryoter ADP-Ribosyltransferasen (aus (Seman et al., 2004))

Beim Menschen wurden bisher vier funktionstüchtige Toxin-verwandte ART-Gene identifiziert (ART1, ART3, ART4, ART5) ((Haag and Koch-Nolte, 1998) (Koch-Nolte et al., 1997)). Bei der Maus sind durch die Duplikation von ART2 bisher sechs ARTs bekannt (ART1, ART2.1, ART2.2, ART3, ART4, ART5). Bei Kaninchen und Ratte sind bisher 5 ARTs identifiziert worden (ART1, ART2, ART3, ART4, ART5). Arginin-spezifische ADP-Ribosylierung konnte für ART1, ART2.1, ART2.2, ART5, ART6.1, ART6.2 und ART7 nachgewiesen werden, wobei sich bei ART1, ART2 und ART5 in der katalytischen Domäne ein für die Argininspezifität typisches R-S-EXE-Motiv findet.

Auf einer Reihe von Zellen konnte ART-Aktivität detektiert werden, wobei die molekulare Charakterisierung der ARTs jedoch offen blieb. So fand sich z.B. ART-Aktivität auf Makrophagen ((Hauschildt et al., 1994; Pellat et al., 1994)). Ferner zeigte sich in Rattengehirnen (Matsuyama and Tsuyama, 1991), sowie in der Nebennierenrinde von Ratten ART-Aktivität (Fujita et al., 1995).

1.2.3 Zielproteine eukaryotischer ADP-Ribosyltransferasen im Kontext des Immunsystems

Theoretisch ist denkbar, dass die ADP-Ribosylierung als *cis*-ADP-Ribosylierung (ADP-Ribosylierung von Proteinen auf der gleichen Zelle), oder als *trans*-ADP-Ribosylierung (ADP-Ribosylierung von Proteinen auf benachbarten Zellen oder von löslichen Proteinen) erfolgen kann (siehe Abb. 7).

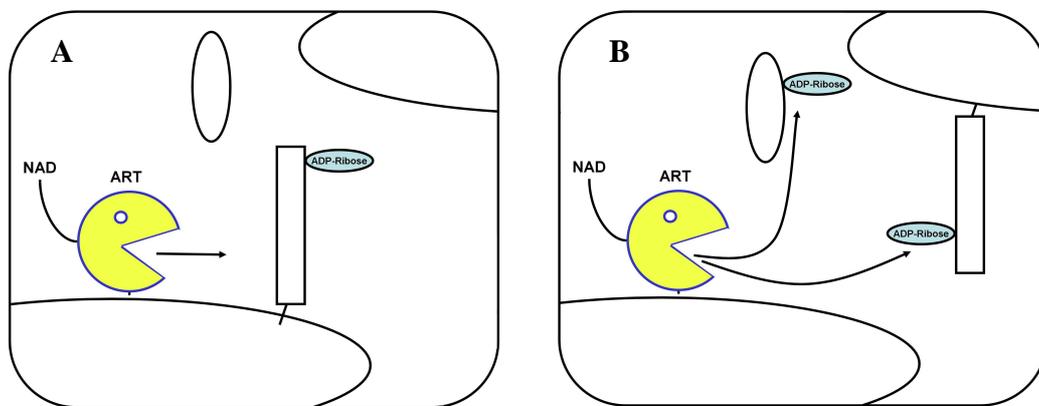


Abbildung 7: Schematische Darstellung der ADP-Ribosylierung in *cis* (A) und in *trans* (B)

1.2.3.1 Zielproteine in *cis*-Stellung

Bekannte Zielproteine von Maus T-Zellen *in cis* sind LFA-1 (α L/ β 2-Integrin), CD8, CD45, CD44, CD43 und CD27 ((Nemoto et al., 1996),(Liu et al., 1999; Okamoto et al., 1998)). Kürzlich von unserer Arbeitsgruppe der Purinorezeptor P2X7 als weiteres Zielprotein *in cis* identifiziert werden.

Dabei scheint die spezifische Lokalisation von ARTs in den Rafts Einfluß auf die Zielproteinspezifität zu haben (Bannas et al., 2005). So konnte das Zielproteinspektrum durch Auflösen der Rafts mit Cyclodextrin erweitert werden (Bannas et al., 2005). Des Weiteren zeigte nur GPI-verankertes, nicht aber transmembran verankertes mART2.2 eine Auto-ADP-Ribosylierung (Bannas et al., 2005).

1.2.3.2 Zielproteinen in *trans*-Stellung

Trans-ADP-Ribosylierung konnte bisher nur an löslichen Zielproteinen nachgewiesen werden. So konnte *in vitro* die ADP-Ribosylierung des „basic fibroblast growth factor 2“ (FGF-2) nachgewiesen werden. Dadurch wurde die Bindung von FGF-2 an Heparin, sowie an seinen Rezeptor (FGFR) moduliert (Boulle et al., 1995). Als weiteres Zielprotein wurde der „platelet-derived growth factor-BB“ (PDGF-BB) beschrieben (Saxty et al., 2001). Dabei zeigte sich beim ADP-ribosylierten PDGF-BB ein Verlust seiner mitogenen und chemotaktischen Wirkung an humanen glatten Muskelzellen der Lunge (Saxty et al., 2001). Darüberhinaus konnte das Tetrapeptid Tuftsin als Zielprotein von ARTs aus heterophilen Leukozyten des Huhns nachgewiesen werden (Terashima et al., 1997). ADP-ribosylierung von Tuftsin inhibierte die Bindung an seinen Rezeptor und seine phagozytosestimulierende Wirkung gegenüber Makrophagen (Terashima et al., 1997). Des Weiteren gelang der Nachweis der ADP-ribosylierung des antibakteriellen Faktors Defensin-1 (Paone et al., 2002). Dabei zeigte sich durch ADP-Ribosylierung eine signifikante Reduktion der antimikrobiellen und zytotoxischen Aktivität. Die Chemotaxis gegenüber T-Lymphozyten zeigte sich durch ADP-Ribosylierung von Defensin-1 hingegen nicht beeinträchtigt. In der broncheoalveolären Lavage von Rauchern konnte ADP-ribosyliertes Defensin *in vivo* detektiert werden (Paone et al., 2002).

Ob es z.B. im Kontext der immunologischen Synapse zu ADP-Ribosylierung von Zielproteinen auf benachbarten Zellen kommt, könnte durch weitere Experimente erfolversprechend untersucht werden.

1.2.4 Effekte der ADP-Ribosylierung auf T-Zell-Funktionen

1.2.4.1 Der NAD induzierter Zelltod („NAD induced cell death“: NICD)

Der extrazelluläre ATP-Stoffwechsel weist eine Reihe von Parallelen zum extrazellulären NAD-Stoffwechsel auf. Beide Nukleotide können von Zellen durch lytische und nicht lytische Mechanismen freigesetzt werden ((Bruzzone et al., 2001) (Contreras et al., 2002)) und durch membranverankerte oder lösliche Ektoenzyme wie NADasen, ATPasen und Phosphodiesterasen hydrolysiert werden ((Goding and Howard, 1998) (Lund et al., 1995)). Beide Nukleotide dienen als Substrate für posttranslationale Modifikationen: Phosphorylierung und ADP-Ribosylierung. Daneben kommen Interaktionen mit spezifischen extrazellulären Rezeptoren vor. ATP bindet z.B. als Ligand an den Purinorezeptor P2X7, einem auf Lymphozyten exprimierten ATP gesteuerten Ionen-Kanal und löst dadurch Apoptose aus ((Di Virgilio et al., 2001) (Zanovello et al., 1990)). Adriouch et al. zeigten 2001, dass auch die Inkubation von nativen T-Zellen mit NAD Apoptose induzierte (Adriouch et al., 2001). 2003 konnten Seman et al. zeigen, dass dieser als NAD induzierter Zelltod bezeichnete Effekt (NICD) durch die ADP-Ribosylierung von P2X7 ausgelöst wird (Seman et al., 2003). Der Adenin-Gruppe scheint innerhalb des NADs eine besondere Rolle zuzukommen, da NAD-Analoga mit Veränderungen an der Adeningruppe wie etheno-NAD, Nikotinamid-Guanidin-Dinukleotid (NGD) und Nikotinamid-Hypoxantin-Dinukleotid (NHD) keinen NICD auslösten (Seman et al., 2003). Die zur P2X7-Aktivierung benötigten NAD-Konzentrationen waren interessanterweise deutlich geringer als die ATP-Konzentrationen. Die Sensitivität gegenüber dem NICD korrelierte mit der Expression von ART2.2. Thymozyten zeigten sich gegenüber dem NICD resistenter als periphere Lymphknoten-Zellen, aktivierte T-Zellen resistenter als ruhende T-Zellen (Haag et al., 2002). Regulatorische T-Zellen (Tregs) waren besonders sensitiv für NICD (Aswad et al., 2005). Auch in NK-T-Zellen konnte NICD induziert werden (Kawamura et al., 2006). ART2 wird von der Zelloberfläche der T-Zellen durch eine Metalloprotease freigesetzt (Kahl et al., 2000) und macht aktivierte T-Zellen somit für den NICD resistent.

Der P2X7-Rezeptor des Mausstammes C57BL/6 trägt eine natürliche Mutation (P451L), die die Sensitivität für die ATP induzierte Öffnung des Ionenkanals drastisch reduzierte (Adriouch et al., 2002). Lymphozyten aus C57BL/6 Mäusen zeigten sich im Verhältnis zu solchen aus BALB/c-Mäusen als weniger empfänglich für NICD (Adriouch et al., 2001). Daher ist anzunehmen, dass viele ART-vermittelte Effekte, die an C57BL/6-Zellen beobachtet wurden, nicht ausschließlich auf NICD zurückzuführen sind.

1.2.4.2 Nicht oder nicht sicher durch NICD erklärbare Effekte von ARTs auf T-Zell-Funktionen

Neben dem oben beschriebenen NICD wurden verschiedene andere Auswirkungen der ADP-Ribosylierung auf T-Zell-Funktionen im Maussystem beschrieben, die hier kurz zusammengefasst werden sollen.

Wang et al. zeigten 1994, dass die ADP-Ribosylierung von T-Zellen die Proliferation und Zytotoxizität von T-Zellen hemmt ((Ohlrogge et al., 2002; Wang et al., 1994)). Liu et al. zeigten 1999 in Kollokalisationsexperimenten, dass ADP-Ribosylierung die Formation der immunologischen Synapse beeinträchtigt (Liu et al., 1999). Auch die „graft versus host reaction“ ließ sich durch ADP-Ribosylierung supprimieren (Liu et al., 2001).

Okamoto et. al. zeigten 1998 *in vivo* eine Reduktion der DTH-Antwort nach intraperitonealer Injektion von NAD. Ferner zeigte sich in dieser Arbeit, dass die Vorbehandlung von T-Zellen *in vitro* mit NAD, ebenso wie die intravenöse Injektion von NAD, das Homing-Verhalten von LK-Zellen beeinflusst. Als möglicherweise an der Inhibierung des Homings beteiligte ADP-ribosylierte Zielproteine wurden CD44, CD43 und LFA-1 vermutet. Leider kann bei den meisten in dieser Arbeit dargestellten Versuchen die verwendete Mauslinie aus der Veröffentlichung nicht genau entnommen werden (entweder C57BL/6 oder B6.C-H-2-Mäuse) (Okamoto et al., 1998). Dies wäre jedoch für eine Beurteilung wichtig, da die C57BL/6-T-Zellen gegenüber dem NICD nicht empfänglich wären. Da jedoch Versuche zur Untersuchung der Apoptose wie DNA-Fragmentierung und Untersuchung der Zellvitalität in derselben Veröffentlichung negativ verliefen, erscheint NICD als Ursache für das veränderte Homingverhalten unwahrscheinlich (Okamoto et al.,

1998). Nemoto et. al. zeigten 1996 an EL4-Lymphoma-Zellen in einem Adhäsions-Assay, dass die homotypische Zellaggregation durch Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung von LFA-1 beeinflussbar ist (Nemoto et al., 1996). Eine Beteiligung von LFA-1 am durch ADP-Ribosylierung inhibierten Homing erscheint somit möglich.

In CTLs aus C57BL/6-Mäusen und mit ART1 transfizierten EL4 Lymphomazellen hemmte die ADP-Ribosylierung die durch anti-CD8-Antikörper vermittelte Autophosphorylierung von Lck sowie die Produktion von IP3 (Liu et al., 1999; Wang et al., 1996). In Lck-Immunpräzipitaten von mit ^{32}P -NAD markierten C57BL/6-CTLs zeigte sich ein kopräzipitiertes 40 kDa großes ADP-ribosyliertes Protein, welches nicht der ART selbst entsprach (Wang et al., 1996). Ob es sich dabei um CD8 handelte, blieb ungeklärt. Zusammengefasst deuten diese Experimente darauf hin, dass die ADP-Ribosylierung von Oberflächenproteinen von C57BL/6-T-Zellen über einen durch CD8 und Lck vermittelten Signalweg hemmend wirken könnte.

1.2.5 Das NAD verstoffwechselnde Ektoenzym CD38

CD 38 ist ein Typ II Transmembranprotein, welches eine potente ekto-NAD-Glycohydrolase-aktivität besitzt ((Ferrero and Malavasi, 1999; Schuber and Lund, 2004)) und auf Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen und dendritischen Zellen exprimiert wird. CD38-defiziente Mäuse zeigten eine beeinträchtigte humorale Immunität, eine verminderte Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen ((Cockayne et al., 1998) (Partida-Sanchez et al., 2001) (Partida-Sanchez et al., 2004)). Die dramatische Reduktion von NADase-Aktivität in CD38^{-/-} Mäusen spricht dafür, dass CD38 die dominierende NADase in den meisten murinen Geweben wie Lymphknoten, Milz und Knochenmark ist (Partida-Sanchez et al., 2001). CD38 wird dabei im Gegensatz zu den murinen ARTs von B-Zellen und aktivierten T-Zellen exprimiert ((Cockayne et al., 1998; Moreno-Garcia et al., 2004)). CD38 inhibiert die ADP-Ribosylierung von T-Zellen in *trans*-Stellung, was sich durch Reduktion des für die ARTs verfügbaren Substrats NAD durch CD38-tragende Zellen erklären lässt (Krebs et al., 2005). Des Weiteren zeigen Lymphozyten von CD38^{-/-} Mäusen eine stärkere etheno-ADP-Ribosylierung als

solche aus Wild-Typ-Mäusen (Krebs et al., 2005). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ARTs und CD38 in Bezug auf die ADP-Ribosylierung Gegenspieler sind. In dieser Betrachtungsweise wären ARTs „NAD-Sensoren“, die die extrazelluläre NAD-Konzentration in ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen übertragen, wohingegen CD38 die ADP-Ribosylierung durch Verminderung des Substrates NAD zeitlich terminiert.

Im NOD/Lt Maus-Modell für den Typ-1 Diabetes zeigte sich nach Depletion von Lymphozyten durch Cyclophosphamid eine verzögerte Repopulation von mArt2.2⁺ im Vergleich zu ART2.2⁻ T-Zellen in der Milz und in den Inseln des Pankreas. Diese verzögerte Repopulation korrelierte mit der Entwicklung von ausgeprägtem Diabetes (Ablamunits et al., 2001). Behandlung von Milz-T-Zellen mit NAD führte zur Inhibierung von anti-CD3 induzierter T-Zell-Aktivierung und Hemmung der Zytotoxizität von CD8-Effektor-Zellen gegenüber den Beta-Zellen des Pankreas (Ablamunits et al., 2001). 2005 konnten Chen et al. in diesem Diabetesmodell nachweisen, dass die Entwicklung des Diabetes sowohl von CD38 als auch von ART2 abhängig war (Chen et al., 2006). Zur Aufklärung der in die Diabetesentwicklung involvierten Signalwege erscheint die Identifizierung von beteiligten ART-Zielproteinen entscheidend.

2 Zielsetzung

Als zentrale Fragestellung der Arbeit sollte der Einfluß der ADP-Ribosylierung auf die Signaltransduktion von T-Zellen untersucht werden. Dabei stand die Suche nach neuen an der Signaltransduktion beteiligten ART-Zielproteinen neben der Analyse bekannter ART-Zielproteine im Vordergrund. Um ART-Zielproteine einfacher darstellen zu können, sollte untersucht werden, ob der schon erfolgreich im FACS eingesetzte 1G4-Antikörper auch im Westernblot Anwendung finden könnte. Die 1G4-Westernblotmethode sollte an bekannten Zielproteinen etabliert werden. Anschließend sollten Zielproteine von ARTs und Tyrosinkinasen untersucht werden, um Schnittstellen zwischen T-Zell-Aktivierung und ADP-Ribosylierung zu identifizieren. Darüber hinaus war es Ziel, diese Interaktionspartner in Abhängigkeit der T-Zellaktivierung zu untersuchen. Weiteres Ziel war es ausreichende quantitative und qualitative Mengen von 1G4-Immunpräzipitaten für massenspektroskopische Untersuchungen herzustellen, um neue ART-Zielproteine, sowie mögliche Interaktionspartner von ART-Zielproteinen identifizieren zu können. Ferner sollte die Fragestellung der ADP-Ribosylierung in *trans*-Stellung, sowie das Zusammenspiel von ARTs und CD38 untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

PTC-100™ PCR-Maschine	MJ Research, Inc Watertown, MA (USA)
Bio-Rad Gene Pulser	Biorad, München
FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Entwicklungsmaschine Fuji FPM 100A	Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf
Xcell II Mini-Cell & Xcell Blot Module	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
MACS MultiStand	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
QTOF II, Massenspektrometer	Micromass (USA)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Nitrozellulose-Hybond-C	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Polyvinylendifluorid-Immobilon (PVDF)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Kodak Biomax MR Röntgenfilm	Kodak Company, Connecticut (USA)
Hyperfilm ECL	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Filter + Kassetten (3H-Thymidin)	Wallac, Turku (Finnland)
NuPAGE 10% Bis-Tris Gel 1.0mm, 10well	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPAGE 10% Bis-Tris Gel 1.0mm, 12well	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel 1.0mm, 12well	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
Küvetten: 0,4 cm Elektroden-Abstand	Biorad, München
Küvetten: 0,2 cm Elektroden-Abstand	Biorad, München
ZOOM Strip pH 3-10, 4-7 und 6-9	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
Aminolink-Kit	Pierce, Rockford (USA)
LS-Columns	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Kulturplatten	Nunc, Roskilde (Dänemark)

LS-Columns Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

3.1.3 Mausstämme

BALBc Jackson Laboratory (USA)

C57BL/6 Mäuse Charles Rivers, Sulzfeld

3.1.4 Zelllinien

DC27.10 Hybridom B. Fleischer, BNI, Hamburg

Jurkat Tet-On (JTO) Clontech, Heidelberg

Zellkulturmedium für Zelllinien:

Vollmedium: RPMI (Gibco BRL) - 10% FCS (Biochrom) - 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL) - 1%, Glutamin (Gibco BRL) - 1% Pyruvat (Gibco BRL) - 4.7µl/500ml -Merkaptoethanol)

3.1.5 Antikörper

3.1.5.1 Konjugierte Antikörper

Ratte α -Maus Art2.2 (IgG2a)-FITC Inst. f. Immunologie, Hamburg
(Nika102)

Ratte α -Maus ART2.1-FITC Inst. f. Immunologie, Hamburg
(A102, IgG2a)

Ratte α -Maus CD8 α -PE (IgG2 α , 536.7) Pharmingen, Heidelberg

Esel α -Maus IgG-PE (H+L, F(ab)2) Dianova, Hamburg

Esel α -Ratten IgG1-PE Dianova, Hamburg

Maus α -etheno-Adenosin-FITC Inst. f. Immunologie, Hamburg
(IgG2 α) (1G4)

Ratte α -humanes CD38-APC Dianova, Hamburg

Ratte α -Maus IgG1 MicroBeads Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

Ziege α -Maus IgG- Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg

Meerrettich-Peroxidase

Ratte α -Maus CD44-PE (IgG2b) DAKO, Hamburg

Ratte α -Maus CD45(RB)-PE (IgG2a) DAKO, Hamburg

Ratte α -Maus CD45(RC)-PE (IgG2a) DAKO, Hamburg

Anti-Phosphotyrosine-HR-POD (RC20)	Transducion Laboratories, Lexington
Maus α -FLAG M2, Agarose konjugiert	SigmaAldrich, Deisenhofen
Anti-Phosphotyrosine, Agarose konjugiert (Klon 4G10, IgG2b)	Upstate, Dundee
Maus α -humanes CD8a-PE (IgG2a)	DAKO, Hamburg

3.1.5.2 Unkonjugierte Antikörper

Maus α -etheno Adenosin (IgG2 α , 1G4)	R. Santella (Columbia University, NY)
Ratte α -Maus CD11a (IgG2 α , M17/4)	Pharmingen, Heidelberg
Ratte α -Maus CD205 (Dec205)	Serotec, Düsseldorf
Hybridomüberstand (IgG2a, NLDC-145)	
α -Maus-PAG (polyklonales Serum):	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Schraven, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Kaninchen α -humanes/murines Lck (Antiserum)	Pharmingen, Heidelberg
Kaninchen α -Maus CD3 (polyklonal)	Inst. f. Immunologie, Hamburg
Ratte α -Maus ART2.2 (R8A102)	Inst. f. Immunologie, Hamburg
Ratte α -Maus Art2.1/Art2.2 B54 (Bella)	Inst. f. Immunologie, Hamburg
Ratte α -humanes Art1	Inst. f. Immunologie, Hamburg

3.1.6 **Chemikalien**

Alle hier nicht angegebenen Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

BSA	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
G418	Gibco BRL, Eggenstein
32P-NAD	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein G-Sepharose	Sigma Aldrich, Deisenhofen

3.1.7 Plasmidkonstrukte

pEGFP-C1	Clontech, Heidelberg
pTRE/hArt1	J. Mac Dermot, London
pME/hArt1	Inst. für Immunologie Hamburg
pME/hCD8 α	Inst. für Immunologie Hamburg
dnLKLF	Inst. für Immunologie Hamburg

3.1.8 Proteinbiochemische Reagenzien

ECL Western Blotting detection reagent	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SeeBlue TM Plus2	Novex, San Diego, CA (USA)
Pre-Stained Standards	
NuPage SDS Page MOPS running buffer	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPage SDS Page transfer buffer	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPage sample reducing agent	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPage LDS sample buffer	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
NuPage Antioxidant	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
StrataClean TM Resin	Stratagene, Heidelberg
Colloidal Blue Staining Kit	Invitrogen, Groningen (Niederlande)
Re Blot Western Blot Recycling Kit"	(Chemicon)

MACS-Buffer: PBS, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA

Antikörperinkubationslösung: TBS, Ziegenserum (10%), Tween 20 (20%)

Blocklösung: 1xTBS - 5% Milchpulver (Kleeblatt) oder 10% Ziegenserum

Antikörperverdünnungslösung: 1xTBS - 5% Milchpulver (Kleeblatt) oder 10% Ziegenserum oder RC20-Blocking- Lösung; zusätzlich 20% Tween 20

RC20-Blocking-Lösung: 10% BSA, 100mM Tris pH 7,5, 1M NaCl, 1% Tween 20

Waschlösung (für die PVDF-Membran): 1xTBS - 0.5% Tween 20

Silberfärbungslösung (der NC-Membran): 1xTBS - 20% AgNO₃ - 40% Na Citrat, 20% FeSO₄

(frisch ansetzen)

Standart Lysepuffer: NaCl (0,1375 M), Tris (0,05 M, pH 7,8), Na-Ortho-Vanadat (1mM), EDTA (0,5mM, pH 8,0), Glycerol (10%ig), NP-40 (1%ig), complete 1x (Proteaseinhibitor, aus 25 facher Stock-Lösung), Igepal (entspricht NP40, 1%ig)

Gey's Puffer : Puffer A: 35g NH₄Cl, 1.85g KCl, 1.5g Na₂HPO₄*12H₂O, 0.119g KH₂PO₄, 5.0g Glukose, 0.05g Phenol Rot in 1 Liter H₂O; Puffer B: 4.2g MgCL₂*6H₂O, 1.4g MgSO₄*7H₂O, 3.4g CaCl₂*2H₂O in 1 Liter H₂O; Puffer C: 22.5g NaHCO₃ in 1 Liter H₂O; 1x Gey's Puffer wurde kurz von Gebrauch angesetzt: 20 % A + 5 % B + 5 % C + 70 % H₂O

3.2 Methoden

3.2.1 Vorbemerkung über die verwendeten Expressionskonstrukte und Zelllinien

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit der murinen Zelllinie DC27.10 und der humanen Zelllinie Jurkat durchgeführt. Die verschiedenen ARTs (Maus ART2.1, Maus ART2.2, Maus ART1 und humanes ART1) wurden in den pME-Vektor kloniert. Dieser enthält als eukaryotischen Selektionmarker eine Neomycinresistenz und den für die Kontrolle der Transfektion wichtigen FLAG Tag, außerdem den SR α -Promotor und ein Poly-Adenylierungssignal (siehe Abb. 8). Stabile DC27.10-Transfektanten, die die verschiedenen ARTs im pME-Vektor exprimierten, waren zum Beginn meiner Arbeit bereits im Labor vorhanden.

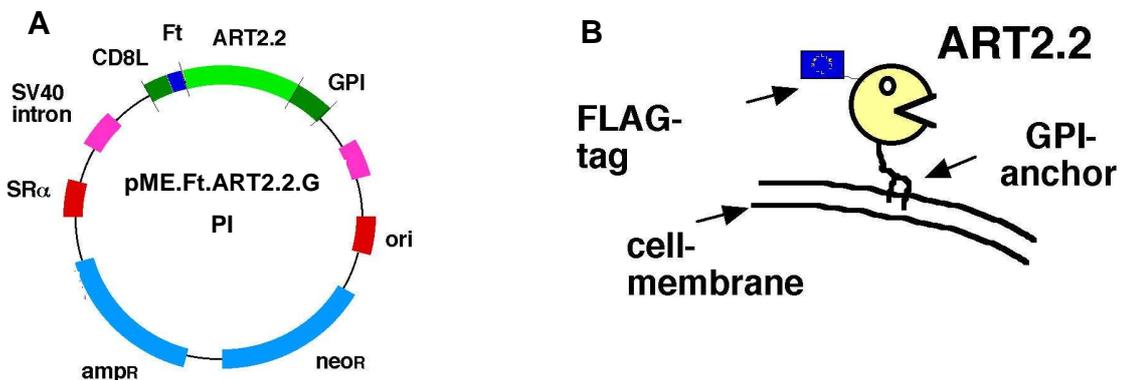


Abbildung 8: Schematische Darstellung des pME-Vektors: A Vektorkarte des pME-Vektors: dargestellt ist der vom CD8 stammende Leaders (CD8L), der Flag-Tag (Ft), sowie der GPI-Ankers (GPI) des ART2.2. B Schematische Darstellung des pME- ART2.2 Expressionskonstruktes: ART2.2 ist als „Pac-Man“ dargestellt, blau dargestellt ist der FLAG-Tag

Für die Experimente in Jurkat Zellen wurden transiente Transfektionen durchgeführt. Das Expressionskonstrukt für humanes ART1 (pTRE-hART1) wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Professor Mc Dermot aus London zur Verfügung gestellt (Abb. 9). Dabei handelt es sich um ein durch Tetracyclin induzierbares System. Die verwendete Zelllinie „Jurkat tet on“ ist mit einem Tetracyclin induzierbaren Transaktivator versehen, welcher ein Fusionsprotein des

bakteriellen Tetrazyklin Repressors (TetR) und der VP16 transaktivierenden Domäne ist. Das verwendete „response plasmid“ (pTRE-hART1) trug ein „tetracycline response element“ innerhalb des Promotors welches die Expression des humanen ART1 steuerte. Aus unbekannter Ursache zeigte sich jedoch auch schon ohne Tetrazyklingleitung die Expression des Transgens (Daten nicht dargestellt). Einige Experimente wurden mit diesem Konstrukt durchgeführt, in einigen Experimenten wurde der pME-Vektor verwendet. Der Vorteil des pME-Vektors liegt wie oben beschrieben darin, die Expression des Transgens mittels anti-FLAG spezifischem Antikörper kontrollieren zu können. Dies erwies sich jedoch als schwierig, da der gegen den FLAG-Tag gerichtete Antikörper M2 unspezifisch mit den Jurkat-Zellen reagierte. Ferner existierte mit dem 1G4-Assay ein zuverlässiges Verfahren, um indirekt auf die Expression schließen zu können.

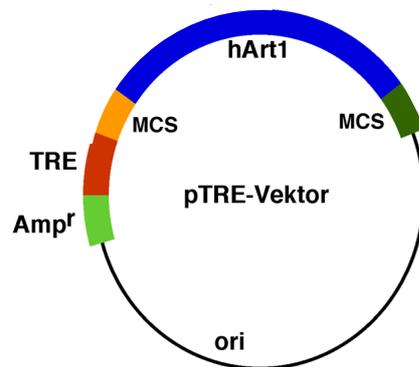


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Expressionskonstruktes pTRE-hART1

Amp: Ampicillin-Resistenz, MCS: multiple cloning side, TRE: Tetracyclin response element, ori: origin of replication

3.2.2 Transiente Transfektion von Lymphomzellen

10 cm Schalen wurden mit 10 ml RPMI-Medium (10%FCS, 1%Natrium-Pyruvat) gefüllt und 30 Min. bei 37° Grad vorgewärmt. Es wurden jeweils 5µg DNA (für DC27.10-Zellen) oder 10 µg DNA (für Jurkat-Tet-on-Zellen) pro Ansatz verwendet. Die DNA wurde direkt in die Küvetten gegeben (für DC27.10-Zellen wurden 0,2 cm Küvetten, für JTO wurden 0,4 cm Küvetten verwendet). Anschließend wurden die Zellen in RPMI (ohne Zusätze) aufgenommen und pro Ansatz $1 \cdot 10^7$ -Zellen in 400µl (für DC27.10-Zellen) oder $7 \cdot 10^6$ -Zellen in 700µl (für JTO-Zellen) verwenden. Die Elektroporation erfolgt bei 960 µF, mit 220 mV (DC27.10-Zellen) oder 280 mV (JTO-Zellen) für ca. 6 Sekunden. Anschließend wurden die elektroporierten Zellen in die vorgewärmten 10 cm Kulturschalen überführt. Die stabilen DC27.10-Transfektanten für mArt1, hArt1, mArt2.1, mArt2.2, NOD/DA und DA/NOD wurden durch Elektroporation, G418-Selektion und Subklonierung generiert.

3.2.3 Präparation muriner Lymphknoten- und Milzzellen

Lymphknoten wurden aus cervikalen, axillären, inguinalen, submandibulären, mesenterialen und paraaortalen Lymphknoten präpariert und in ca. 8 ml RPMI (10% FCS) aufgenommen (siehe Abb. 10). Die Lymphknoten-Zellen wurden mit Hilfe einer Nytex-Membran aus dem Gewebeverband gelöst. Zur Herstellung einer Zellsuspension wurden die Lymphknoten mit Hilfe des Stempels einer 2 ml Spritze durch die Membran gedrückt, wobei Binde- und Stromagewebe in der Membran zurückblieb. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen.

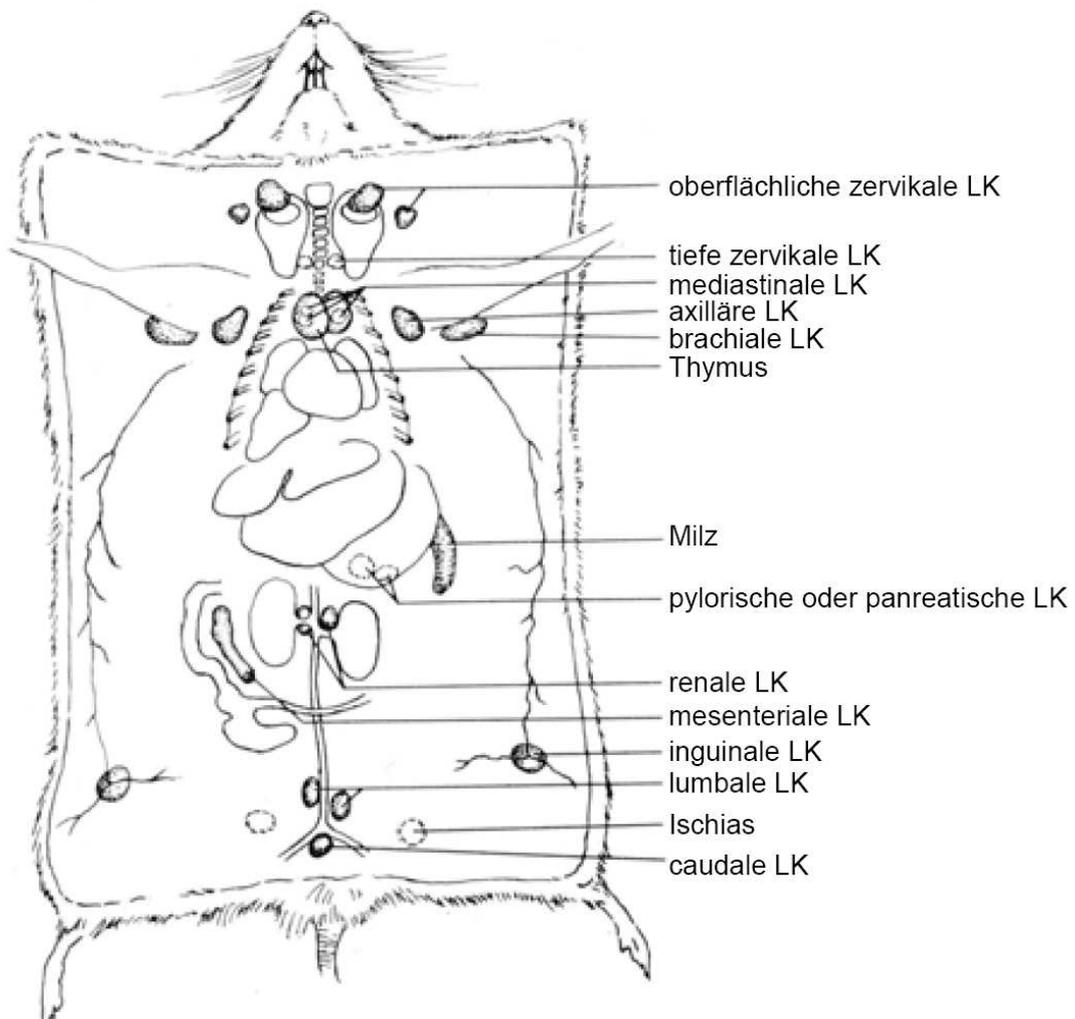


Abbildung 10: Lage der lymphatischen Organe bei der Maus. Die Abbildung zeigt eine Zeichnung, die die Lage der lymphatischen Organe einer Maus in situ wiedergibt. (modifiziert nach http://www.eulep.org/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php)

Milzzellen wurde ebenfalls mit Hilfe einer Nytex-Membran in eine Zellsuspension überführt (siehe oben). Anschließend wurden die Erythrozyten mittels Inkubation der Zellen in 10ml Gey's Puffer (siehe unter Materialien) für 10 Minuten auf Eis lysiert. Die Zellen wurden zwei Mal gewaschen und nach Bestimmung der Zellzahl sofort für die Versuche eingesetzt.

3.2.4 Depletion von B-Zellen

1×10^7 -Zellen wurden in 80 μ l PBS (1% BSA) aufgenommen und mit Macs-Beats (10 μ l aMs-IgG₁-Microbeats auf 1×10^7 -Zellen) für 20 Min. bei 4° C inkubiert. Die LS-Säulen wurden in einen Magnetständer eingeführt (MACS MultiStand, Miltenyi) und zwei mal mit PBS (1% BSA) gewaschen. Anschließend wurden die mit den Macs-Beats inkubierte Zell-Lösung über die Säule gegeben und der Durchlauf wurde weiter verwendet.

3.2.5 Stimulation von Zellen mit Natrium-Ortho-Vanadat (Vanadat)

Der Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Vanadat wurde vor der Stimulation aktiviert. Zu dem Zweck wurden zu 100 μ l Vanadat (50mM) 30 μ l H₂O₂(30%ig) pipettiert. Dies führte dazu, dass die Lösung sich gelb verfärbte. Anschließend wurde eine 1:5 Verdünnung in ddH₂O durchgeführt (+520 μ l ddH₂O). Für die Stimulierung wurden 10 μ l aktiviertes Vanadat pro 1×10^7 Zellen pro 1 ml RPMI verwendet. Die Zellen wurden in einem Eppendorf Gefäß im Heizblock bei 37°C vorgewärmt. Die Stimulierung erfolgte für 3 Minuten. Sie wurde gestartet durch das Hinzupipettieren von Vanadat und beendet durch die Lyse in Standard-Lysepuffer (siehe Material). Die Zellen wurden dabei 20 Sekunden vor Ende der 3 Minuten in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Pellet in 100 μ l Lysepuffer resuspendiert.

3.2.6 Stimulation von Zellen mit α -CD3, PMA und Ionomycin

Die Stimulierung von nativen Lymphozyten mit α -CD3 (10 μ g pro Ansatz) und PMA (10ng pro Ansatz) oder Ionomycin (1 μ M) wurden analog zur Stimulierung mit Vanadat durchgeführt.

3.2.7 Behandlung von Zellen mit ³²P-NAD

Die Zellen wurden einmal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 10 μ Ci ³²P-NAD für 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zentrifugieren wurde das Zellpellet so häufig mit 10 ml PBS gewaschen, bis im Überstand keine Strahlung mehr detektierbar war.

3.2.8 Behandlung von Zellen mit etheno-NAD

Die Zellen wurden für 30 Min. bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen von etheno-NAD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und weiter verwendet. Bei den Versuchen an primären Maus-Zellen wurde zusätzlich noch 2mM ADPR verwendet, bei der Maus-Zelllinie BALBc wurde zusätzlich noch 1mM DTT dazugegeben.

3.2.9 Behandlung von Zellen mit PI-PLC

5×10^6 Zellen wurden in 50µl RPMI aufgenommen und mit 2µl PI-PLC (0,1 U/µl) für 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand für Westernblotanalysen verwendet.

3.2.10 Lysieren von Zellen

Zellen wurden abzentrifugiert und in 100µl/ 1×10^7 Zellen lysiert. Anschließend wurde das Lysat für 30 Min. auf Eis inkubiert. Es folgten zwei Zentrifugationen bei 15000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 4°C, bei denen jeweils der Überstand überführt und weiter verwendet wurde.

Zur Untersuchung GPI-verankerter Proteine wurde das Pellet erneut in 100µl/ 1×10^7 -Zellen aufgenommen und für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (15000 rpm) wurde der Überstand weiter verwendet.

3.2.11 " Fluorescence activated cell sorter " (FACS)

Mittels Durchflußzytometrie (oder „Fluorescence activated cell sorter“, FACS) ist es möglich unter Verwendung von Fluorochrom markierten Antikörpern eine große Anzahl von Zellen auf Expression bestimmte Proteinen hin zu untersuchen. Die Zellen werden dabei in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch eine Laseroptik geführt. Das Gerät misst für jede einzelne Zelle die Parameter „forward scatter (FCS)“, „side scatter“ (SSC) und die Fluoreszenzintensität, wobei am verwendeten FACS „Calibur“ 4 verschiedene Spektren messbar sind. So können Zellen anhand ihrer Größe (FCS), ihrer Granulierung (SSC) und ihrer Fluoreszenzintensität untersucht werden. Die beiden erstgenannten Eigenschaften einer Zelle werden anhand ihrer Lichtstreuung gemessen, die zuletzt genannte

aufgrund ihrer Fluoreszenzmerkmale. Als Fluorochrome dienten Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC).

Die Zellen wurden vor der Antikörperinkubation 1 Mal mit 3ml PBS gewaschen. Die Antikörper-Inkubationen erfolgten jeweils für 30 Min. auf Eis. Es wurden entweder direkt Fluoreszenzmarkierte Antikörper oder unkonjugierte Primärantikörper und Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper verwendet. Nach jeder Inkubation folgte ein Waschschrift mit 3 ml PBS. Pro FACS-Röhrchen wurden jeweils ca. 2×10^5 – 2×10^6 Zellen eingesetzt.

3.2.12 Sortieren von Zellen

Eine weitere Funktion des Durchflußytometers ermöglicht es, Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenzmarkierung zu sortieren. Mit Hilfe dieser Technik wurden zwei Jurkat-Zelllinien mit unterschiedlicher CD38 Expression hergestellt, die mit CD38^{hi} (für hohe Expression) und CD38^{lo} (für geringe Expression) bezeichnet wurden.

3.2.13 Immunpräzipitation

20µl Protein G-Sepharose-Matrix wurde mit PBS (1% Triton-X-100) gewaschen. Anschließend wurden die für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper in 200µl Lysepuffer überführt und für mind. 45 Min. mit der Protein G-Sepharose bei 4°C auf dem Roller inkubiert. Die Sepharose wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze überführt, der Überstand beim Waschen wurde jeweils mit Hilfe einer Vakuumentrifuge und einer dünnen Injektionsnadel entfernt. Die für die Immunpräzipitation bestimmten Lysate wurden für 30 Min. in 20µl Protein G-Sepharose vorinkubiert („Preclearing“), um unspezifische Bindungen an die Sepharose zu vermeiden. Anschließend wurde der Überstand auf die an Protein G-Sepharose gekoppelten Antikörper gegeben und für 45 Minuten bei 4° C auf dem Roller inkubiert. Die Präzipitate wurden drei Mal mit 1ml Lysepuffer gewaschen. Alle Waschritte wurden mit Lysepuffer durchgeführt, um Protease- und Phosphataseaktivität zu minimieren. Für die Immunpräzipitation der Abb.29 (Massenspektroskopie) wurde der 1G4-Antikörper mittels Aminolink-Kit (Pierce) an Sepharose immobilisiert, um Antikörperkontaminationen zu minimieren.

Im Versuch der Abb. 32 wurde eine zweifache Immunpräzipitation durchgeführt: Nach der ersten Immunpräzipitation mit dem 1G4-Antikörper wurden die Präzipitate für 5 Minuten bei 95°C in folgenden Puffers inkubiert: 50mM Tris-HCl (pH8.0), 0,5%SDS und 5mM DTT. Der Überstand wurde anschließend mit Lysepuffer auf 0,1%SDS verdünnt und in einer zweiten Immunpräzipitation mit dem 4G10-Antikörper eingesetzt.

3.2.14 SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE Analyse wurde das "NuPAGE" System von Invitrogen verwendet. Die Proben wurden in LDS-Ladepuffer und 50 mM DTT 10 Minuten bei 70°C erhitzt. Es wurden 10% und 4-12% Bic-Tris-Gele verwendet, sowie der Laufpuffer „MOPS“, wobei die 4-12%igen Gele für den hochmolekularen, die 10%igen Gele für den niedermolekularen Bereich verwendet wurden. Als Molekularmarker wurde „SeeBlue“ (Novex) verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 200V durchgeführt und dauerte ca. 45 Minuten.

3.2.15 Westernblot

Das Westernblotverfahren wurde mit dem Invitrogen "X Cell II Blotting" System im "Wet-Blot"-Verfahren durchgeführt. Es wurden eine PVDF Membran und eine NC-Membran für den Blot verwendet. Das Gel wurde luftblasenfrei zwischen die NC-Membran (Anoden-Seite) und die PVDF-Membran (Kathoden-Seite) gelegt. Auf die Membranen wurden jeweils Filterpapier und Blotschwämme gelegt. Der Blot wurde nass in Transferpuffer übereinander geschichtet. Das Blotten erfolgte bei 30 Volt erst für 2 Min. auf die NC-Membran und dann nach Umkehr der Polarität für 90 Minuten auf die PVDF-Membran. Die PVDF-Membran wurde für die Immundetektion, die NC-Membran für eine parallele Silberfärbung eingesetzt.

3.2.16 Colloidal Coomassie-Färbung:

Es wurde das Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen) verwendet. Das Gel wurde für 4-12 Stunden in der Färbelösung geschwenkt und anschließend über Nacht mit ddH₂O entfärbt, um den Hintergrund zu minimieren.

3.2.17 Silberfärbung

Die Nitrozellulose- (NC) Membran wurde für ca. 1 Min. in 10 ml Silberfärbungs-Lösung (1xTBS, 20% AgNO₃, 40% Na Citrat, 20% FeSO₄) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit ddH₂O gewaschen und luftgetrocknet.

3.2.18 Immundetektion und Chemilumineszenzreaktion

Nach Inkubation der PVDF-Membran für 30 Minuten in Blocklösung (entweder Milchpulver für Experimente mit Phosphotyrosin oder Ziegen Serum für alle anderen Experimente) bei 4°C wurde die Membran anschließend für 1 Stunde in 10 ml Antikörperverdünnungslösung mit dem Primärantikörper in der angegebenen Verdünnung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in Waschlösung für je vier Minuten wurde mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiertem Sekundärantikörpern eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Die Membranen wurden vier Mal für je 7 Min gewaschen. Anschließend wurde die Chemilumineszenzreaktion zur Visualisierung der Proben durchgeführt. Hierzu wurde wegen der sehr hohen Sensitivität und sehr kurzen Entwicklungszeit das "ECL Western Blotting detection reagent" (Amershan-Pharmacia) verwendet. Die Membran wurde in Plastikfolie eingewickelt. Anschließend wurde ein Hyperfilm ECL (Amershan Pharmacia) für 10 Sekunden bis 10 Minuten je nach Intensität aufgelegt und sofort entwickelt.

3.2.19 Strippen von PVDF-Membranen

Hierzu wurde das "Re Blot Western Blot Recycling Kit" (Chemicon) verwendet und nach den Angaben des darin enthaltenen Protokolls vorgegangen.

3.2.20 Proteinsequenzierung durch Nano-Elektrospray-Massenspektroskopie

Die Identifizierung etheno-ADP-ribosylierter Proteine erfolgte durch eine Nano-Elektrospray-Massenspektroskopie (Nano-ESI-MS/MS) von IG4-Immunpräzipitaten (Chernushevich et al., 2001). IG4 Immunpräzipitate wurden in einem SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt und mittels Coomassie angefärbt. Es zeigten sich abgrenzbare Proteinbanden, die mit einem Skalpell ausgeschnitten wurden. Diese einzelnen Banden wurden im Gel mit Trypsin verdaut, so dass eine Peptidlösung

entstand. Im wesentlichen können vier Schritte unterschieden werden: 1. Nano-Elektrospray-Ionisierung, 2. erste Massenspektroskopie, 3. Fragmentierung, 4. zweite Massenspektroskopie.

Für die Nano-Elektrospray-Ionisierung werden die zu analysierenden Peptide mittels einer Kapillarströmung, die aus Stickstoff und der Peptidlösung besteht, in einem elektrischen Feld desolvatisiert und ionisiert. Als Nano-Elektrospray-Ionen-Spray-Quelle wurde eine metallisierte Glas-Kapillare mit einer Spitze von $1\mu\text{m}$ inneren Durchmessers verwendet, von der die zu analysierende Lösung gesprayed wurde. Der Ionenstrom war dabei bei ca. 20-40 nl/min. Auch sehr geringe Volumina ($1\text{-}2\mu\text{l}$) können dadurch für ca. 30-120 Min. untersucht werden. Die sich daran anschließende Massenanalyse (Verhältnis Masse zu Ladung) der Ionen erfolgte mit einem Q-TOF-Massenspektrometer (Abb. 11).

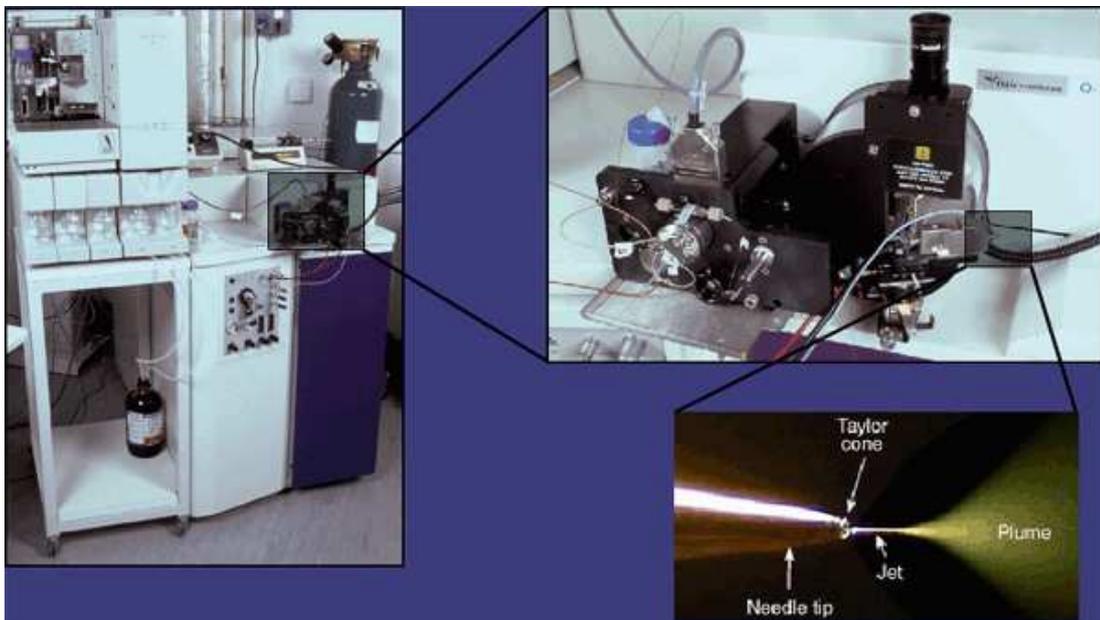


Abbildung 11: Dargestellung eines MS/MS-Q-TOF-Massenspektrometers
(Quelle: www.jic.bbsrc.ac.uk/services/proteomics/qtof2.)

Im Quadrupol-Massenspektrometer (Q) durchfliegen die Ionen eine Anordnung von vier zylinderförmigen Elektroden, die parallel verlaufen und deren Schnittpunkte mit einer Ebene senkrecht zur Zylinderachse ein Quadrat bilden. Die gegenüberliegenden Elektroden befinden sich auf gleichem Potential und zwischen benachbarten Elektroden wird eine Gleich- und eine Wechselspannung angelegt. Das Verhältnis von Gleich- und Wechselspannung bestimmt (bei konstanter Frequenz), welche Ionen die Anordnung passieren können. Haben die Ionen nicht die richtige Masse, werden sie nach außen beschleunigt und kollidieren mit den Elektroden. Der Vorteil dieses Massenspektrometers besteht somit in der genauen Justierung der zu untersuchenden Ionengrößen. Im Flugzeit-Massenspektrometer (TOF: time-of-flight mass spectrometer) findet die Massenbestimmung (Masse/Ladung) durch Messen der Flugzeit statt. Dazu werden die Ionen im Elektrischen Feld beschleunigt und durchlaufen eine Flugstrecke. Die dafür benötigte Flugzeit wird durch schnelle Elektronik gemessen. Der Vorteil dieses Massenspektrometers ist eine sehr effiziente Auflösung. Das dabei gewonnene Massenspektrum wird in einer Datenbankanalyse auf Übereinstimmung mit bekannten Aminosäuresequenzmustern überprüft. Durch diese Datenbankanalyse können sowohl die Anzahl der Aminosäuren als auch eine mögliche Abfolge des Peptids bestimmt werden. Die Proteinsequenzierung wurde in Kooperation mit dem Institut für Zellbiochemie des UKEs durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Detektion von etheno-ADP-Ribosylierung mit dem monoklonalen Antikörper 1G4

Die Untersuchung anderer posttranslationaler Modifikationen wie z.B. der Phosphorylierung wurde durch die Verwendung von für spezielle phosphorylierte Aminosäuren spezifische Antikörper (wie z.B. anti-Phosphotyrosin-Antikörper) wesentlich erleichtert. Leider existieren vergleichbare Antikörper für ADP-ribosylierte Aminosäuren (wie z.B. denkbar: anti-ADP-Ribose-Arginin-Antikörper) bisher nicht. Im Jahre 1988 wurde jedoch von Young et al. an der Columbia Universität im Rahmen von Forschungen über die Kanzerogenität von Vinylchlorid ein monoklonaler Antikörper (1G4) entwickelt, der für ein mit einer etheno-Gruppe modifiziertes Adenosin spezifisch ist (Young and Santella, 1988) (Abb. 12). Dieser etheno-Adenosin-Rest ist ebenfalls in etheno-NAD vorhanden, welches von den ARTs als Substrat katalysiert wird ((Hingorani and Ho, 1988) (Klebl and Pette, 1996)).

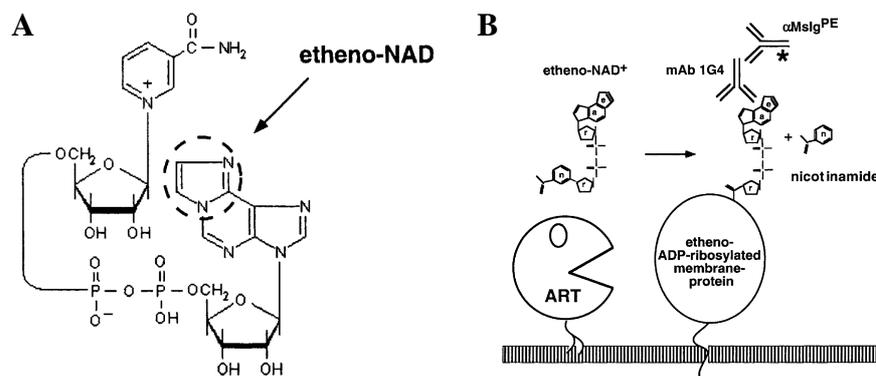


Abbildung 12: Schematische Darstellung des etheno-NAD/1G4-Assays

A Die etheno-Gruppe, die etheno-NAD von NAD unterscheidet, ist mit einem Kreis versehen.
B Die ART ist hier als „Pacman“ dargestellt. Die N-glykosidische Bindung des etheno-NADs wird gespalten, so dass Nikotinamid frei wird. Der etheno-ADP-Riboserest wird α -glykosidisch mit einem Zielprotein verknüpft. Der etheno-Adenosin-spezifische monoklonale Antikörper 1G4 bindet an etheno-ADP-ribosylierte Zielproteine. Mittels Fluochrom-markiertem Zweitantikörper (z.B. α -Ms IgPE) ist etheno-ADP-Ribosylierung so in der Durchflußzytometrie, mittels Peroxidase konjugiertem Zweitantikörper ist etheno-ADP-Ribosylierung so im Westernblot nachweisbar.

Unserer Arbeitsgruppe gelang es mit Hilfe dieses Antikörpers, Mono-ADP-Ribosylierung von Zielproteinen durch ARTs darzustellen (Krebs et al., 2003). In dieser Arbeit wurde der 1G4-Antikörper in der Durchflußzytometrie (FACS), im Westernblot und in der Immunpräzipitation untersucht. Dabei wurde der 1G4 Westernblot mit der traditionellen Methode zur Darstellung von ADP-ribosylierten Zielproteinen, der SDS-PAGE-Autoradiographie unter Verwendung von ^{32}P markiertem NAD^+ verglichen und 1G4-Immunpräzipitate zur Identifizierung neuer Zielproteine mittels Nano-Elektrospray Massenspektroskopie verwendet.

4.1.1 Durchflußzytometrische Untersuchungen von etheno-ADP-Ribosylierung mit dem 1G4-Antikörper

DC27.10-Zellen wurden mit mART1, mART2.1, mART2.2 und hART1 stabil transfiziert. Der Nachweis der stabilen Expression der ARTs wurde durchflußzytometrisch mit dem anti-Flag-spezifischen Antikörpers M2 und PE markiertem Zweitantikörper erbracht. Alle stabil transfizierten Zellen zeigten eine 100%ige Anfärbung mit dem M2-Antikörper (Abb. 13, erste Zeile). Die Spezifität der verschiedenen ART-Transfektanten zeigte sich durch Anfärbung mit monoklonalen Antikörpern gegen hART1, mART2.1 und mART2.2. (Abb. 13, zweite Zeile). Der Spezifitätsnachweis für mART1, für das kein monoklonaler Antikörper zur Verfügung stand, wurde durch negative Anfärbbarkeit mit für mART2.1 und hART1 spezifischen Antikörpern erbracht. Die gleichen Transfektanten wurden mit etheno-NAD inkubiert und anschließend mit 1G4 angefärbt (Abb. 13, dritte Zeile). Dabei zeigte sich der Einbau von etheno-ADP-Ribose in Zelloberflächenproteine durch alle untersuchte Transferasen. Die Anfärbbarkeit mit 1G4 war dabei sowohl von der Expression der ART auf der Zelloberfläche als auch von der Inkubation mit etheno-NAD abhängig. Analoge Ergebnisse zeigten transient transfizierte humane Jurkat^{hART1}-Zellen (Abb. 13, vierte Zeile).

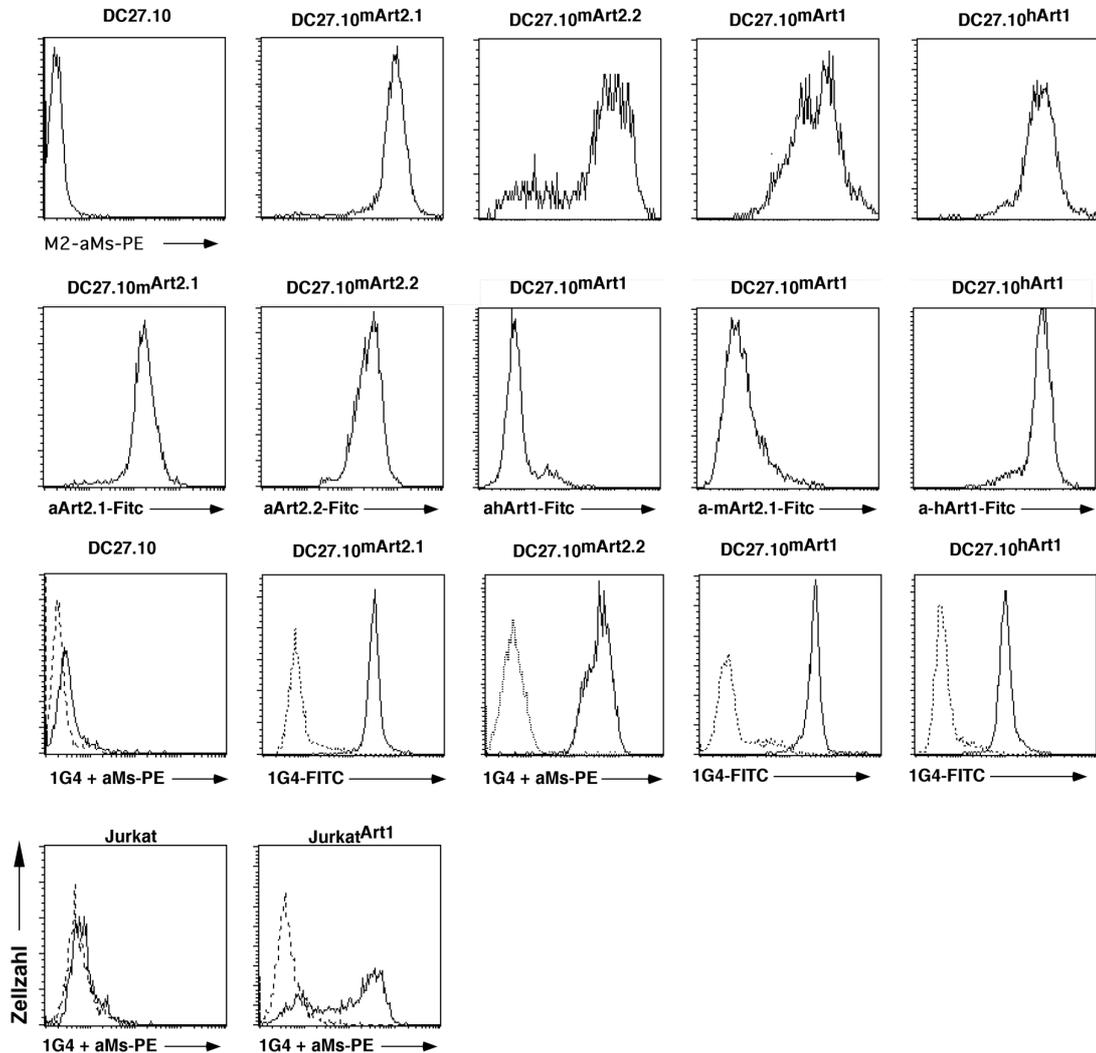


Abbildung 13: Darstellung von etheno-ADP-Ribosylierung im FACS

Zeile 1: Verschiedene stabil transfizierte DC.27.10-Mauslymphomazellen wurden mit dem monoklonalen anti-Flag Antikörper M2 inkubiert und anschließend mit einem PE markierten Zweitantikörper angefärbt; X-Achse: Log. Fluoreszenzintensität, Y-Achse: Zellzahl; **Zeile 2:** Die DC27.10-Transfektanten aus Zeile 1 wurden mit ART spezifischen, mit FITC direkt konjugierten monoklonalen Antikörpern aus der Ratte angefärbt. **Zeile 3:** Die DC27.10-Transfektanten aus Zeile 1 wurden jeweils 30 Min bei 37°C mit (durchgezogene Linie) oder ohne (gestrichelte Linie) 100µM etheno-NAD inkubiert; anschließend wurden sie mit 1G4-FITC direkt konjugiertem Antikörper oder unkonjugiertem 1G4 Antikörper und PE markierten Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus) angefärbt. **Zeile 4:** Jurkat-Zellen wurden transient mit humanem ART1 transfiziert und zwei Tage nach der Transfektion mit (durchgezogene Linie) oder ohne (gestrichelte Linie) 100µM etheno-NAD inkubiert. Die Zellen wurden ebenfalls mit dem 1G4 Antikörper und PE markiertem Zweitantikörper angefärbt.

4.1.2 Vergleich der Methoden etheno-NAD/1G4-Westernblot und ³²P-NAD/Autoradiographie zur Darstellung von ART-Zielproteinen

DC27.10^{mART1}-, DC27.10^{mART2.1}-, DC27.10^{mART2.2}-, und Jurkat^{hART1}-Transfektanten wurden mit radioaktiv markiertem ³²P-NAD inkubiert und anschließend lysiert. Daraufhin wurden eine SDS-Gel-Elektrophorese, ein Westernblot und eine Autoradiographie durchgeführt (Abb. 14A). Dieselben Transfektanten und zusätzlich noch DC27.10^{hART1} wurden mit etheno-NAD inkubiert und in einer Westernblotanalyse mit dem 1G4-Antikörper untersucht (Abb. 14B).

4.1.2.1 Vergleich von Ganzzelllysaten nach etheno-NAD und ³²P-NAD Markierung

In der Autoradiographie der Abb. 14A zeigten sich mehrere ADP-ribosylierte Proteinbanden, wobei sich die größten Banden im Bereich von ca. 200 kDa, die kleinsten im Bereich von ca. 20 kDa abbildeten. Das Bandenmuster der verschiedenen Transferasen sah im hochmolekularen Bereich sehr ähnlich aus, größere Unterschiede fanden sich im niedermolekularen Bereich. Die dort erscheinenden prominenten Banden konnten als auto-ADP-ribosylierte ARTs identifiziert werden (siehe dazu Abb. 28). Insgesamt ließen sich 14 Banden abgrenzen (siehe nummerierte Striche in Abb. 14A). Dabei sind die Banden 2, 3, 4, 5, 6 bei allen drei Transferasen vorhanden, die Banden 1, 10 (entspricht mART2.2) und 12 sind nur in der mART2.2-Spur vorhanden. Die Banden 6.1, 6.2, 7 und 11 sind sowohl in der mART2.2 als auch in der mART2.1-Spur vorhanden. Da die Intensität der Banden zwischen den Transferasen aber sehr unterschiedlich war, erscheint es schwierig, Aussagen zu treffen, ob die Proteine, die den Banden 1 und 12 entsprechen, wirklich nur von mART2.2 modifiziert werden und ob die Proteine, die den Banden 6.1, 6.2, 7 und 11 entsprechen, tatsächlich nur von mART2.1 und mART2.2 und nicht ebenfalls von mART1 modifiziert werden.

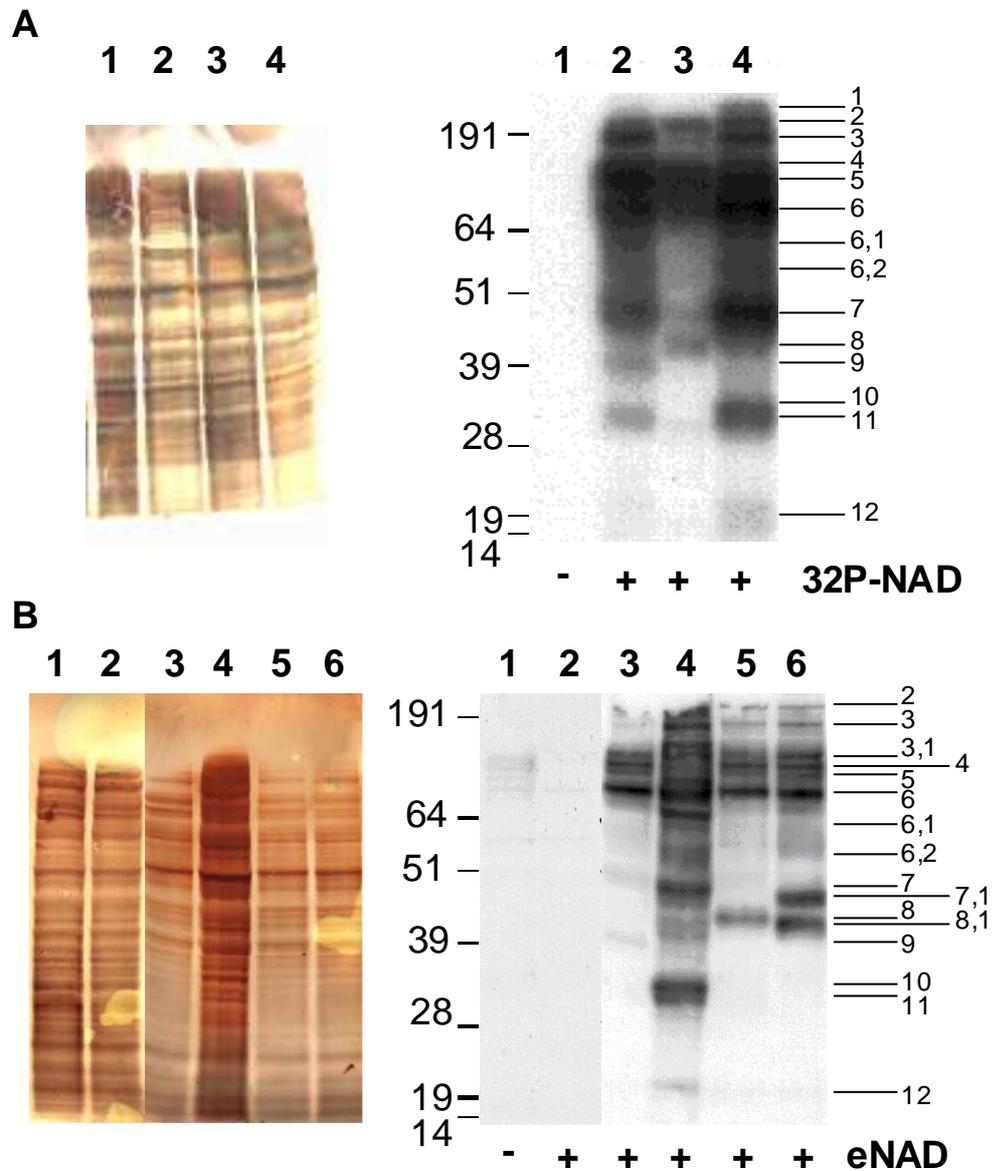


Abbildung 14: Vergleich von etheno-NAD- und ³²P-NAD-Markierung in DC2710-Zellen

A Nachweis ADP-ribosylierter Zielproteine mit der klassischen Methode mit „heißem“ NAD (³²P-NAD) und Autoradiographie: Stabile DC27.10-ART-Transfektanten wurden mit ³²P-NAD (Spuren 1 – 4) inkubiert und nach Behandlung mit Phosphatidylinositol- spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) lysiert. Die Ganzzelllysate (GZL) wurde in einer SDS-Page aufgetrennt und auf PVDF- und NC-Membran geblottet, der PI-PLC-Überstand ist in Abb. 15 zu sehen. Links ist die Silberfärbung der NC-Membran, rechts die Autoradiographie der PVDF-Membran dargestellt. Die Striche markieren potenzielle ADP-ribosylierte Zielproteine. Spur 1: untransfiziert ohne ³²P-NAD; Spur 2: mART2.1; Spur 3: mART1; Spur 4: mART2.2 **B**. Nachweis ADP-ribosylierten Zielproteine unter Verwendung von etheno-NAD und 1G4-Westernblotanalyse: Stabile DC27.10-Transfektanten wurden mit 20µM etheno-NAD inkubiert und anschließend in 1%Igepal lysiert. Die Ganzzelllysate wurden im Westernblot mit dem 1G4-Antikörper untersucht (rechts dargestellt); links die korrespondierende Silberfärbung. Spur1: untransfizierte Zellen; Spur 2: mART2.2 ohne etheno-NAD; Spur 3: mART2.1; Spur 4: mART2.2; Spur 5: mART1; Spur 6: hART1

Die Fraktion der Ganzzelllysate zeigte im 1G4-Blot im Vergleich zur Autoradiographie ein sehr ähnliches Bandenmuster (Abb. 14B). Die 5 Banden, die in der Autoradiographie in allen Transferasen erschienen, lassen sich im 1G4-Blot ähnlich abgrenzen (die Banden 2, 3, 4, 5, 6), zusätzlich erkennt man noch eine Bande zwischen 3 und 4 (3.1), die ebenfalls von allen Transferasen modifiziert wird. Bande 4 der Autoradiographie entspricht wohl zwei Banden in der 1G4-Detektion –nämlich Bande 3.1 und 4. Die Bande 1 aus der Autoradiographie ist nicht abgebildet, der entsprechende Bereich ist jedoch durch eine Luftblase im Westernblot überlagert. Die Banden 6.1, 6.2, 7, 10, 11, 12 sind nur in der mART2.2-Spur vorhanden. Diese zusätzlichen Banden entsprechen aber nicht sicher Zielproteinen, die nur von mART2.2 modifiziert werden, da es in dieser Spur zu einer stärkeren Beladung gekommen ist als auf den anderen Spuren- wie in der Silberfärbung ersichtlich. Banden 8, 9, 10 entsprechen mART1, mART2.1 und mART2.2. Banden 8.1 und 7.1 sind nur in der hART1-Spur vorhanden, wobei es sich möglicherweise bei beiden um das hART1 handelt. Es könnte sich um unterschiedlich glykosylierte Varianten von hART1 handeln. Eine von beiden Banden sicher dem hART1 entspricht. Durch Unterschiede in der Glykosylierung liessen sich möglicherweise auch die Doppelbande 10, 11 in der mART2.2-Spur erklären (siehe auch den Abschnitt 4.5.4 über die Automodifikation von ARTs).

In Jurkat^{hART1}-Transfektanten zeigte sich der Einbau von AD³²P-Ribose in Proteine zwischen ca. 40 und 200 kDa Größe (Abb. 15A). Es ließen sich 10 Banden abgrenzen (siehe beschriftete Striche in Abb. 15.). In der 1G4-Westernblotanalyse der Jurkat^{hART1}-Transfektanten zeigten sich 11 spezifische Banden im Bereich zwischen 40- und 200 –kDa (Abb. 15B, Spur2), neben unspezifischen Banden, die sich auch in nicht mit etheno-NAD behandelten Zellen (Abb. 15B, Spur 1) und untransfizierten mit etheno-NAD behandelten Zellen darstellten (Daten nicht gezeigt). Bis auf die Bande 8 stimmten die Banden der Autoradiographie vollständig mit den Banden des 1G4-Westernblots überein. Bei der Doppel-Bande 10,11 im 1G4-Westernblot handelt es sich wahrscheinlich um das hART1, welches hier sehr prominent erscheint, da die Zellen der Abb. 15B im Gegensatz zu den Zellen der Abb. 15A nicht mit PI-PLC vorbehandelt wurden. Es fällt auf, dass die Zielproteine

in den humanen Jurkat-Zellen eine ähnliche Größenverteilung wie die der murinen DC27.10-Zellen zeigen. Ob es sich dabei jedoch wirklich um die gleichen Zielproteine handelt, müsste durch weitere Versuche untersucht werden.

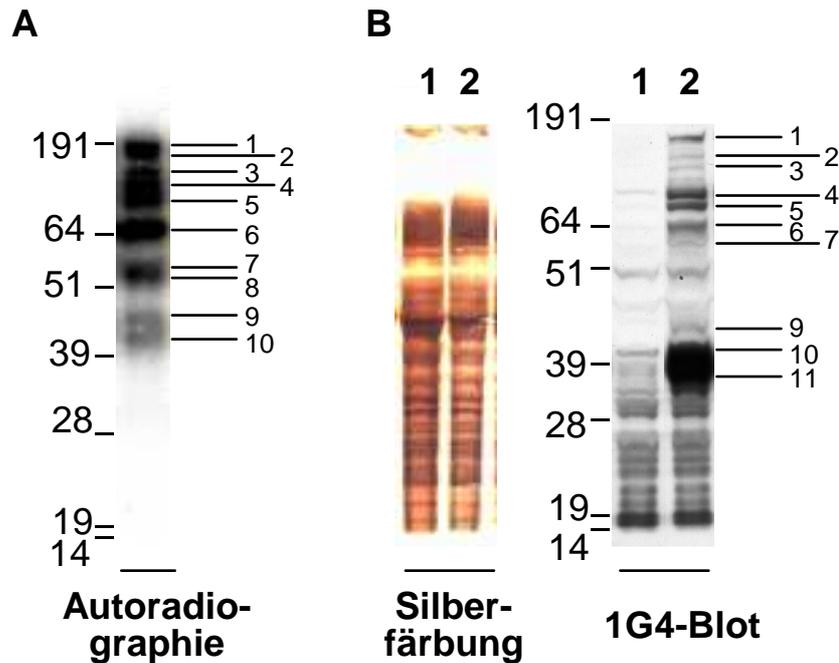


Abbildung 15: Vergleich von etheno-NAD- und ^{32}P -NAD-Markierung Jurkat-Zellen

A Jurkat-Zellen wurden transient mit humanem ART1 transfiziert und zwei Tage nach der Transfektion mit ^{32}P -NAD inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PI-PLC behandelt und lysiert. Gezeigt ist die Autoradiographie von Jurkat-Ganzzelllysaten. Die Striche markieren ADP-ribosylierte Zielproteine. **B** Jurkat-Zellen wurden mit humanem ART1 transfiziert wie unter A und anschließend mit $20\mu\text{M}$ etheno-NAD (Spur 2) oder ohne etheno-NAD (Spur 1) inkubiert und anschließend geblottet und mit dem 1G4-Antikörper detektiert. In diesem Versuch wurden die Zellen nicht mit PI-PLC vorbehandelt. Links ist die korrespondierende Silberfärbung dargestellt. Die Pfeile markieren potenzielle ADP-ribosylierte Zielproteine

Es zeigt sich, dass die Methode der Westernblotanalyse mit dem 1G4-Antikörper vergleichbare Ergebnisse liefert wie die herkömmliche Methode mit radioaktivem NAD. ^{32}P -NAD und etheno-NAD scheinen in die gleichen Zielproteine der DC27.10-Zellen eingebaut zu werden, wobei dies für einzelne Zielproteine auch gezeigt werden konnte (siehe das Beispiel LFA-1 in (Krebs et al., 2003) und humanes CD8alpha in Abb. 27). Ob es darüber hinaus für die unterschiedlichen

Transferasen spezifische Zielproteine gibt, läßt sich anhand der Ganzzelllysate nicht eindeutig beurteilen. Diese Fragestellung wurde für CD44 und LFA-1 im Abschnitt 4.5.2 anhand von Immunpräzipitationen untersucht.

Ferner ist nicht auszuschließen, dass eine Bande im Westernblot in Wirklichkeit mehreren Zielproteinen entspricht. Dies könnte z.B. durch 2-D-Gel-Elektrophorese weiter untersucht werden. Methodisch lässt sich aber feststellen, dass die Zielproteinbanden in den 1G4-Westernblots wesentlich schärfer und besser abgrenzbar erschienen als bei der Autoradiographie. Ein weiterer Vorteil dieses Assays ist ferner die Erleichterung, nicht radioaktiv arbeiten zu müssen.

4.1.2.2 Vergleich der GPI-verankerten Proteine nach etheno-NAD und 32 P-NAD Markierung

DC27.10^{mART1}-, DC27.10^{mART2.1}-, DC27.10^{mART2.2}-, und Jurkat^{hART1}-Transfektanten wurden mit radioaktiv markiertem 32 P-NAD oder etheno-NAD inkubiert. Vor der Lyse wurden die Zellen mit PI-PLC behandelt. Abb. 16 zeigt die Gegenüberstellung von Autoradiographie und 1G4-Westernblotanalyse in DC27.10-Zellen. Die prominentesten Banden waren dabei die Transferasen selbst (siehe Pfeile in Abb. 16), von denen bekannt ist, dass sie sich selbst modifizieren (Karsten et al., 1997). Der genaue Nachweis der Automodifikation wurde in Abb. 28 geführt. Bei den anderen Banden handelt es sich höchstwahrscheinlich um nicht GPI-verankerte Proteine aus den Ganzzelllysaten, da von der Größe her identische Banden im Gesamtzelllysate erscheinen (siehe Abb. 14).

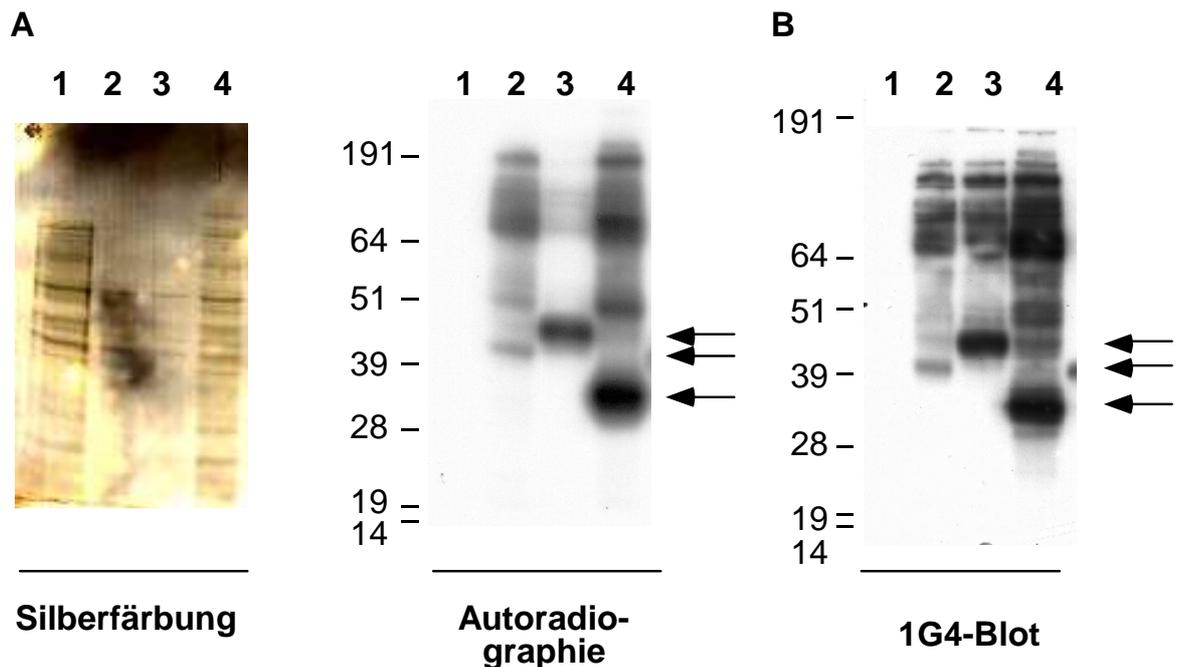


Abbildung 16: Darstellung von Zielproteinen der ARTs innerhalb der Fraktion der GPI-verankerten Proteine in DC27.10-Zellen

A Die DC27.10-Zellen aus Abb. 14 wurden nach 32 P-NAD-Behandlung mit PI-PLC inkubiert, um die GPI-verankerten Proteine gesondert zu untersuchen. Rechts: Autoradiographie; links Silberfärbung dargestellt. Spur 1: untransfizierte Zellen; Spur 2: mART2.1; Spur 3: mART1; Spur 4: mART2.2.

B DC27.10-Zellen wurden nach etheno-NAD-Markierung mit PI-PLC inkubiert. Der Überstand wurde im 1G4-Westernblot untersucht. Die Spuren entsprechen denen in (A)

Ebenso wurden die PI-PLC-Überstände von Jurkat^{hART1}-Transfektanten in Autoradiographie und 1G4-Westernblotanalyse gegenübergestellt (Abb. 17). Es zeigte sich eine prominente Bande im Bereich um ca. 40 kDa. Andere spezifische Banden im hochmolekularen Bereich zeigten sich nicht.

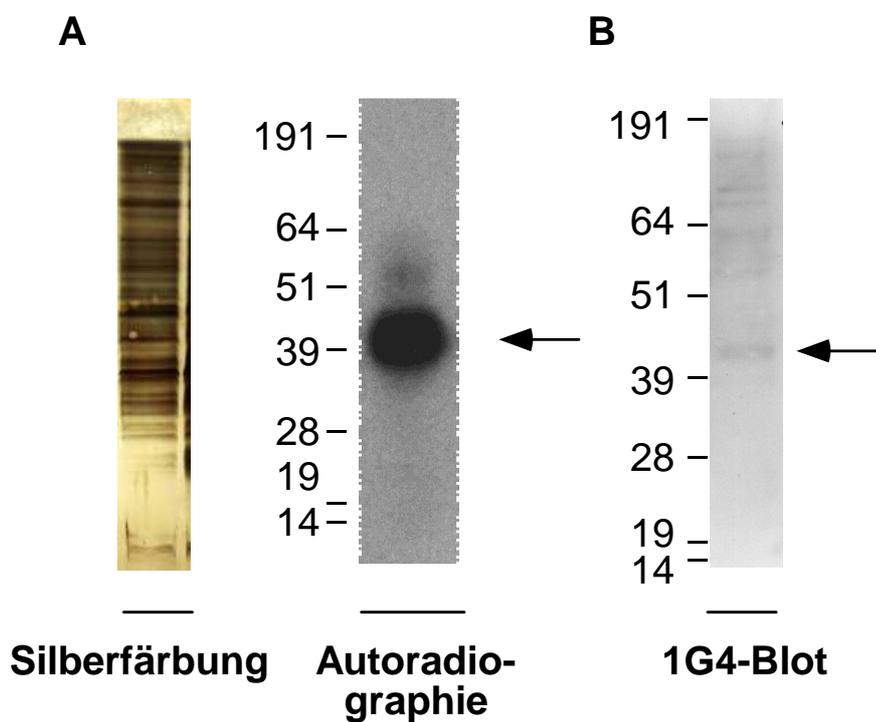


Abbildung 17: Darstellung von Zielproteinen der ARTs innerhalb der Fraktion der GPI-verankerten Proteine in Jurkat-Zellen

A Die Autoradiographie zeigt den PI-PLC-Überstand von mit ³²P-NAD markierten Jurkat-Zellen.

Links ist die korrespondierende Silberfärbung dargestellt. **B** Der 1G4-Blot zeigt den PI-PLC-Überstand von mit etheno-NAD (20µM) vorbehandelten Jurkat-Zellen.

4.1.3 Untersuchung von ADP-Ribosylierung in *trans*-Stellung

Um die Fragestellung zu untersuchen, ob ARTs Zielproteine auf benachbarten nicht ART exprimierenden Zellen modifizieren können (ADP-Ribosylierung in *trans*-Stellung), wurden ART exprimierende Zellen und nicht ART exprimierende Zellen in möglichst kleinem Volumen mit etheno-NAD inkubiert. Als Marker für nicht ART exprimierende Zellen diente dabei dnLKLf, ein Fusionsprotein der DNA-bindenden Domäne des Transkriptionsfaktors LKLf mit dem „green fluorescent protein“ (GFP), welches zu anderen Zwecken in unserem Labor hergestellt worden war. ART transfizierte Jurkat Zellen wurden mit dnLKLf transfizierten Jurkat-Zellen gemischt und mit etheno-NAD inkubiert. Anschließend wurden Doppelfluoreszenz-Analysen durchgeführt (Abb. 18).

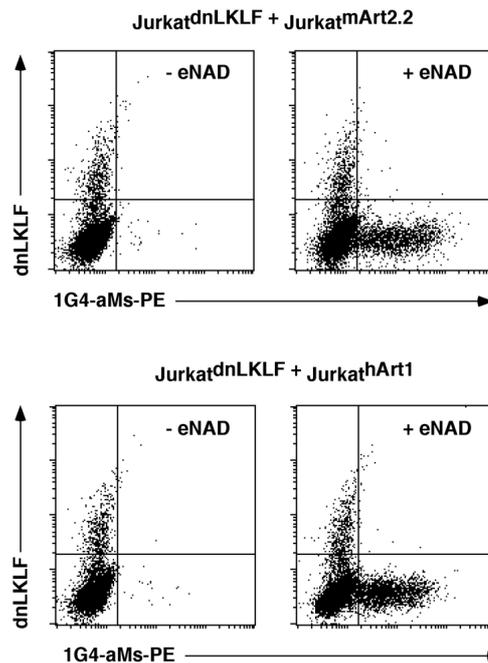


Abbildung 18: Untersuchung von *trans*-ADP-Ribosylierung

Jurkat-Zellen wurden transient mit hART1, mART2.2 und dnLKLf transfiziert. Die Zellen wurden an Tag zwei nach Transfektion geerntet. $2,5 \cdot 10^6$ ART transfizierte Zellen wurden mit $2,5 \cdot 10^6$ dnLKLf transfizierten Zellen in $100 \mu\text{l}$ gemischt und mit $100 \mu\text{M}$ ethenoNAD für 30 Min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine FACS-Anfärbung mit 1G4 und aMs-PE durchgeführt. Das dnLKLf-Konstrukt fluoreszierte dabei grün (FL-1). Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von dreien.

Es zeigten sich nach Anfärbung mit dem 1G4 Antikörper und PE konjugiertem Zweitantikörper keine doppelt positiv fluoreszierenden Zellen, was dafür spricht, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen ($5 \cdot 10^6$ Zellen auf $100 \mu\text{l}$) keine ADP-Ribosylierung in *trans*-Stellung für die Transferasen mART2.2 und hART1 stattfand. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es unter Adhäsionsbedingungen, wie sie z.B. in der immunologischen Synapse vorkommen, zu ADP-Ribosylierung von Proteinen auch auf fremden Zielzellen kommen könnte.

4.1.4 Untersuchung von chimären Varianten aus Maus- und Ratten-ART2

Die Enzymeigenschaften von mART2.2 und rtART2.2 unterscheiden sich deutlich. Von mART2.2 ist beschrieben, dass es sich selbst und andere Zielproteine ADP-ribosylieren kann, es zeigte jedoch nur eine geringe NADase-Aktivität. RtART2.2 (RT6.2) besitzt hingegen eine ausgeprägte NADase-Aktivität. Die ADP-Ribosylierung fremder Zelloberflächenproteine konnte nicht beobachtet werden, es zeigte sich jedoch eine Auto-ADP-Ribosyltransferaseaktivität (Karsten et al., 1997). Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Eigenschaften der verschiedenen ARTs und der chimären Konstrukte im Vergleich.

Transferase	„Allo“- modifikation	Glykohydrolase- Aktivität	Auto- modifikation	Immunpräzipitation mit Nika102
mART2.2	+	-	+	+
RT6.2/rtART2.2	-	++	+	-
NOD/DA	-	++	+	-
DA/NOD	+	-	+	+

Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Eigenschaften von mART2.2, RT6.2 und der chimäre Varianten NOD/DA und DA/NOD. Als „Allo“-Modifikation (gr. fremd) wurde hier im Gegensatz zu Automodifikation die Modifizierung von Zielproteinen bezeichnet, die nicht der ART selbst entsprechen.

Um die Fragestellung zu untersuchen, ob sich die Eigenschaft von ARTs verändert, wenn man Teile des Enzyms austauscht, waren chimäre Varianten aus Ratten RT6 (rtART2.2) und mART2.2 kloniert worden (Karsten, 1999). Beim Konstrukt „NOD/DA“ wurde der N-terminale Teil des mART2.2 (ursprünglich kloniert aus einer NOD Maus) und der C-terminale Teil des RT6 (ursprünglich kloniert aus einer DA-Ratte), im Konstrukt „DA/NOD“ der N-terminale Teil vom RT6 und der C-terminale Teil vom mART2.2 fusioniert (siehe Abb. 19). In der oben erwähnten Dissertationsschrift von Stefan Karsten war gezeigt worden, dass der C-terminale Teil des mART2.2 die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität enthält, ebenso wie der C-terminale Teil des rtART2.2 die NADase-Aktivität enthält.

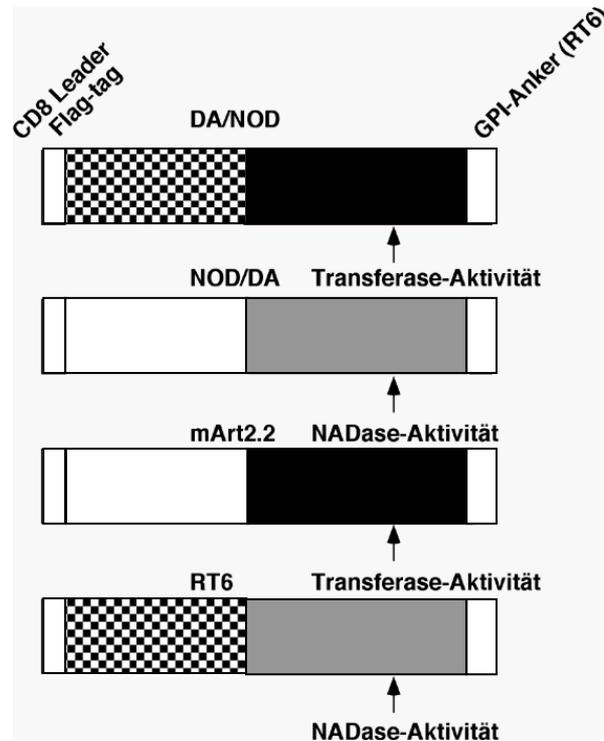


Abbildung 19: Schematische Darstellung der chimären Konstrukte aus Ratten ART2.2 (RT6.2) und Maus ART2.2

Mit der neuen Methode der 1G4-Westernblotanalyse bestand nun die Möglichkeit, die zum Teil bereits beschriebenen und zum Teil postulierten Eigenschaften dieser chimären Varianten genauer und vervollständigend zu untersuchen ((Haag et al., 1995; Karsten et al., 1997)).

In der FACS-Untersuchung zeigte sich in beiden chimären Varianten eine ADP-Ribosylierung von Oberflächenproteinen (Abb. 20, oberer Teil). Die Expression wurde durch M2-Färbung nachgewiesen (Abb. 20, unterer Teil).

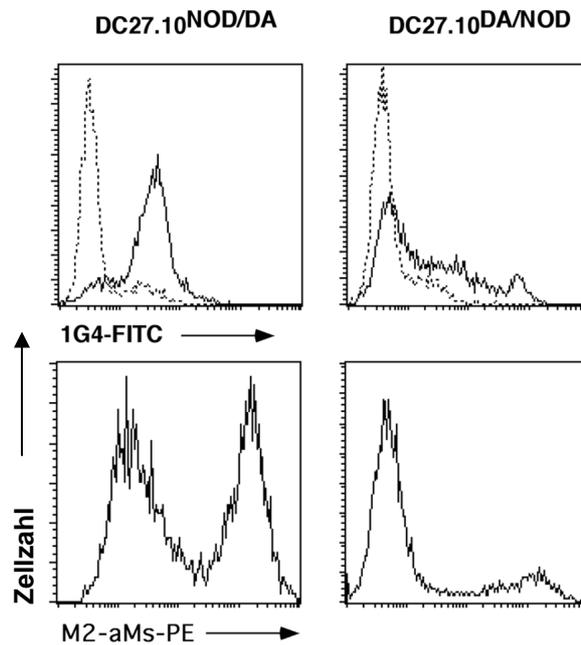


Abbildung 20: Darstellung der etheno-ADP-ribosylierung von DC27.10^{NOD/DA} und DC27.10^{DA/NOD} im FACS

Stabil transfizierte DC27.10-Zellen wurden ohne (gestrichelte Linie) oder mit 100 μ M etheno-NAD (durchgezogene Linie) inkubiert und anschließend mit einem 1G4-FITC Antikörper angefärbt (obere Abbildungen). Die Expression der Konstrukte wurde mit dem anti-Flag spezifischen Antikörper M2 und PE konjugiertem Zweitantikörper dargestellt (untere Abbildungen).

Um die Fraktionen der Ganzzelllysate und die der GPI-verankerten Proteine gesondert zu untersuchen, wurden die Zellen vor der Lyse mit PI-PLC behandelt (s.o.). Im Ganzzelllysat aus DA/NOD-Transfektanten fand sich ein dem mART2.2 ähnelndes ADP-Ribosylierungsmuster. In NOD/DA-Transfektanten hingegen zeigten sich keine ADP-ribosylierten Proteine im Ganzzelllysat (Abb. 21A). Per Immunpräzipitation konnte das bereits als Zielprotein von mART2.2 bekannte LFA-1 auch als Zielprotein der DA/NOD-, nicht jedoch der NOD/DA-Transfektanten nachgewiesen werden (siehe Abb. 21B). In der Fraktion der GPI-verankerten Proteine zeigten sich bei beiden chimären Varianten prominente Banden um ca. 40kDa, für NOD/DA bei ca. 39 kDa, für DA/NOD ca. bei 46 kDa (siehe Pfeile in Abb. 21C), die sehr wahrscheinlich den automodifizierten ARTs entsprechen. Somit besitzen beide chimären Varianten, wie beschrieben, die Fähigkeit zur

Automodifikation. Abb. 21D zeigt eine Immunpräzipitation mit dem mART2.2 spezifischen Antikörper Nika 102. Dieser präzipitierte nur die Variante DA/NOD, womit sich das Epitop, welches er erkennt, auf die C-terminale Hälfte des mART2.2 lokalisieren lässt.

Mit Hilfe von PI-PLC-Verdau und 1G4-Westernblotanalyse ließ sich so die Unterscheidung zwischen Automodifikation und „Allomodifikation“ gut untersuchen und die Ergebnisse von Karsten et al. konnten bestätigt werden.

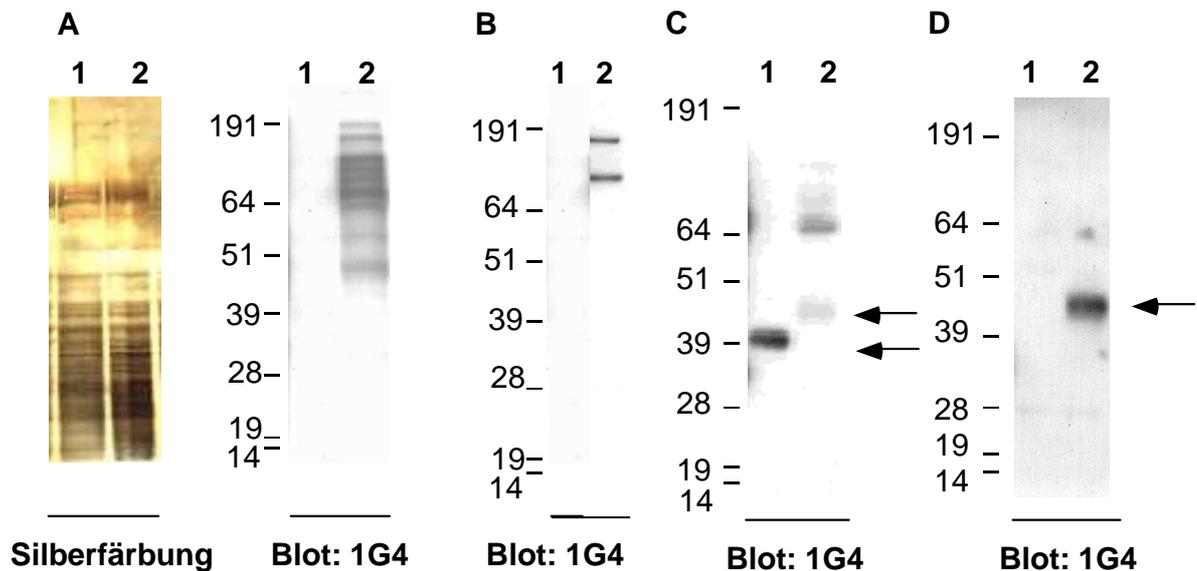


Abbildung 21: Darstellung der Zelloberflächen ADP-ribosylierung von DC27.10^{NOD/DA} und DC27.10^{DA/NOD} im Westernblot

Die chimären Varianten NOD/DA und DA/NOD wurden stabil in DC27.10-Zellen transfiziert. In Spur 1 wurden jeweils NOD/DA-Transfektanten, in Spur 2 wurden DA/NOD-Transfektanten verwendet. **A** Rechts dargestellt ist eine 1G4-Westernblotanalyse von Ganzzelllysaten nach Behandlung der Zellen mit 100 μ M etheno-NAD und PI-PLC. Links abgebildet ist die korrespondierende Silberfärbung. **B** Dargestellt ist eine Immunpräzipitation mit dem LFA-1 spezifischen Antikörper M17-4 aus den Zelllysaten aus A; Die Detektion des Westernblots erfolgte mit dem 1G4-Antikörper. **C** Dargestellt ist eine 1G4-Westernblotanalyse, die den PI-PLC-Überstand aus A zeigt. **D** Spur 1 und 2 zeigen Immunpräzipitate mit dem mART2.2 spezifischen monoklonalen Antikörper NIKA102 (aus den PI-PLC-Überständen aus C. Anschließend erfolgte eine Westernblotanalyse mit dem 1G4-Antikörper.

4.1.5 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen CD38 und ARTs in *cis*-Stellung

ADP-Ribosylzyklasen, wie z.B. die membranständigen Ektoenzyme CD38 und CD157, verwenden ebenso wie ARTs NAD als Substrat, mit dem Unterschied, dass sie nach der Freisetzung von Nikotinamid die Bildung einer intramolekularen Bindung katalysieren, die in zyklischer ADP-Ribose (cADPR) resultiert (Abb.22).

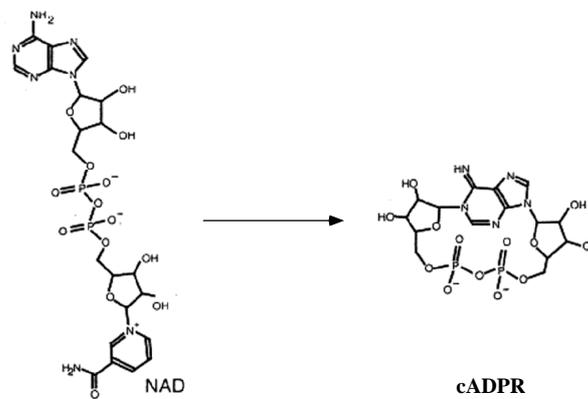


Abbildung 22: Schematische Darstellung der ADP-Cyclase-Reaktion, die durch CD38 katalysiert wird

Der Ribose-Rest der ADP-Ribose wird dabei auf das N₁-Atom vom Adenin übertragen (Yamamoto-Katayama et al., 2002). Daneben besitzt CD38 eine Glykohydrolaseaktivität (oder auch NADase-Aktivität), die jedoch wesentlich stärker ausgeprägt ist als bei ARTs. Die dramatische Reduktion der NADase-Aktivität in CD38^{-/-} Mäusen spricht dafür, dass CD38 die dominierende NADase in den meisten murinen Geweben wie Lymphknoten, Milz und Knochenmark ist (Partida-Sanchez et al., 2001).

Um Wechselwirkungen zwischen diesen beiden NAD-metabolisierenden Enzymen zu untersuchen, wurde ADP-Ribosylierung in Abhängigkeit von der CD38-Expression untersucht. Dazu wurden zwei unterschiedliche Jurkat-Varianten durch Subklonierung und Sortierung am FACS etabliert, die eine starke und eine schwache CD38 Expression zeigten (genannt CD38^{hi} und CD38^{lo}, Abb. 23.A). CD38^{hi}- und

CD38^{lo}-Zellen wurden transient mit hART1 transfiziert und nach Inkubation mit etheno-NAD im FACS mit 1G4 angefärbt. Die JTO^{lo}-Zellen zeigten dabei nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von etheno-NAD eine stärkere Oberflächen-ADP-Ribosylierung als die JTO^{hi}-Zellen (Abb. 23C). Um Unterschiede in der Transfektionseffizienz auszuschließen wurden die Zellen zusätzlich mit einem Expressions-Konstrukt für das „enhanced green fluorescent protein“ (eGFP) cotransfiziert (Abb. 23B). Dabei zeigte sich, dass die Transfektionseffizienz in den CD38^{hi}-Zellen sogar stärker war als die der CD38^{lo}-Zellen. Somit war die stärkere 1G4-Anfärbbarkeit der CD38^{lo}-Zellen nicht mit eventuell unterschiedlicher Transfektionseffizienz zu erklären.

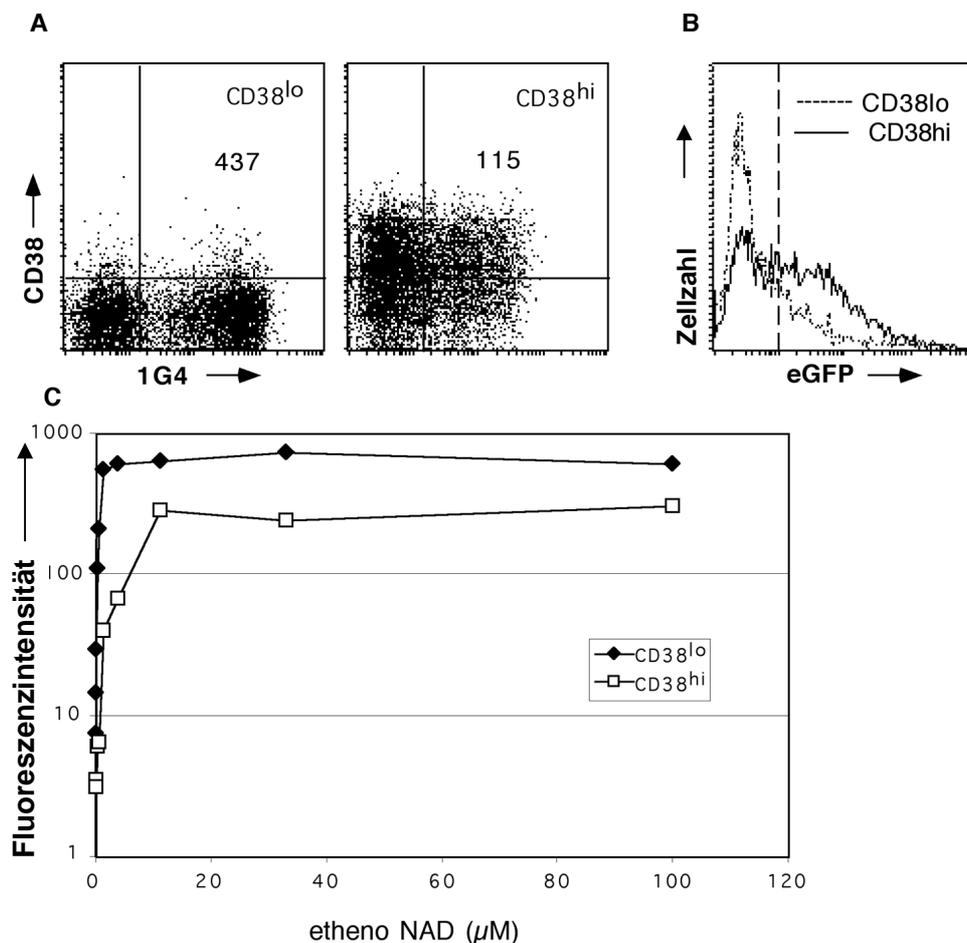


Abbildung 23: Interaktion von hART1 und CD38 in cis-Stellung

Jurkat Tet On Zellen wurden durch Subklonierung und FACS-Sortierung in Varianten mit starker und geringer CD38 Expression selektiert: CD38^{lo} und CD38^{hi}. Diese Varianten wurden transient mit

hART1 transfiziert und zwei Tage nach Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen von etheno-NAD inkubiert und anschließend mit dem 1G4-Antikörper und PE markiertem Zweitantikörper im FACS angefärbt. **A** Doppelfärbung mit CD38 spezifischem Antikörper (APC direkt markiert) und 1G4-PE-Markierung bei 100µM etheno-NAD-Konzentration. Die Zahlen re. oben geben die mittlere Fluoreszenzintensität bezüglich der 1G4-Anfärbbarkeit an. **B** Kotransfektion mit einem Expressionskonstrukt für „green fluorescent protein“ (GFP) als Kontrolle für die Transfektionseffizienz bei 100µM etheno-NAD-Konzentration. **C** Mittlere Fluoreszenzintensität der 1G4-Anfärbung in Abhängigkeit von der etheno-NAD-Konzentration..

Diese Ergebnisse zeigen, dass CD38 die ADP-Ribosylierung von Zielproteinen in *cis*-Stellung hemmt. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist die direkte Konkurrenz von CD38 und hART1 um das Substrat NAD. Diese Beobachtungen erklären auch Schwierigkeiten bei dem Nachweis von ADP-Ribosylierung im Westernblot. Dieser gelang für ³²P-NAD nur für CD38^{lo}-Zellen (5 Versuche mit CD38^{hi}-Zellen zeigten keinen Einbau ADP-ribosylierter Proteine). Auch die gute Anfärbbarkeit der DC27.10-Zellen lässt sich mit der geringer Expression von CD38 auf diesen Zellen plausibel erklären. Analog dazu konnte von unserer Arbeitsgruppe (Christian Krebs) an Maus-Lymphozyten gezeigt werden, dass CD38 positive B-Zellen die etheno-ADP-Ribosylierung von T-Zellen auch in *trans*-Stellung inhibieren (Krebs et al., 2005).

4.2 Zielproteine der ARTs

4.2.1 Etheno-ADP-ribosylierung von LFA-1, CD44 und CD45

Eine häufig verwendete Methode zur Darstellung von Zielproteinen der ARTs war die Markierung von Zellen mit radioaktivem NAD (^{32}P -NAD), Immunpräzipitation des vermuteten Zielproteins und anschließende Autoradiographie. Verschiedene Zielproteine wurden so identifiziert unter anderem LFA-1, CD44 und CD45 ((Nemoto et al., 1996), (Okamoto et al., 1998)). Um zu untersuchen, ob die 1G4-Westernblotmethode geeignet ist, Zielproteine von ARTs darzustellen, wurden diese bekannten Zielproteine nach etheno-NAD-Markierung immunpräzipitiert und im 1G4-Westernblot untersucht. Es zeigten sich Banden, die den für die Proteine beschriebenen molekularen Größen entsprachen und sich ohne Hintergrund klar abgrenzten (Abb. 24).

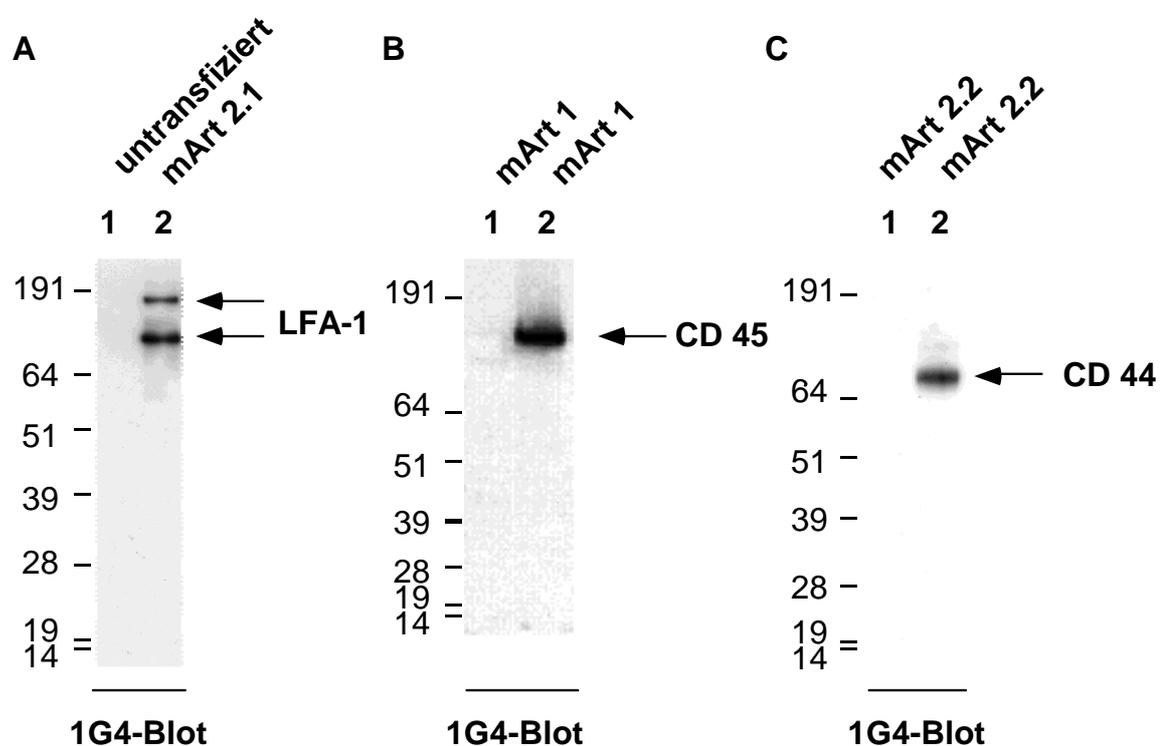


Abbildung 24: Darstellung der Zielproteine LFA-1, CD45 und CD44 mittels

Immunpräzipitation und 1G4 Westernblotanalyse

DC27.10^{mART2.2}-, DC27.10^{mART1}- und DC27.10^{hART1}-Transfektanten wurden mit 100 μM etheno-NAD

(mART2.1) oder 20µM etheno-NAD (mART2.2, mART1) inkubiert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden mit monoklonalen Antikörper gegen LFA-1 (M17/4, Ratte anti-Maus CD11a), CD44 (Ratte anti-Maus CD44-PE) und CD45 (Ratte anti-Maus CD45-PE) immunpräzipitiert und anschließend im Westernblot mit dem 1G4 Antikörper detektiert. Die Pfeile markieren die Höhe der detektierten Proteine. **A** Untransfizierte Zellen (Spur 1) und mART2.1-Transfektanten (Spur 2), 100µM etheno-NAD; **B** Spur 1: mART1-Transfektanten ohne etheno-NAD; Spur 2: mART.1-Transfektanten mit 20µM etheno-NAD; **C** mART2.2-Transfektanten präzipitiert mit Antikörper gleichen Isotyps, der ein irrelevantes Antigen erkennt (anti-II-2). Spur 2: mART2.2-Transfektanten mit 20µM etheno-NAD;

4.2.2 Etheno-ADP-Ribosylierung von LFA-1 und CD44 durch unterschiedliche ARTs

Die Zielproteinspezifität unterschiedlicher Transferasen wurde an den Proteinen LFA-1 und CD44 untersucht. Es zeigte sich in allen untersuchten DC27.10-Transfektanten (mART1, hART1, mART2.1 und mART2.2) eine Markierung beider Ketten von LFA-1 (Abb. 25). mART2.1 und mART2.2 zeigten eine ähnlich starke Markierung beider Ketten, wobei beim mART2.1 die β -Kette stärker als die α -Kette markiert erschien, im Gegensatz zu ähnlich starker Intensität der beiden LFA-1-Ketten beim mART2.2 und mART1.

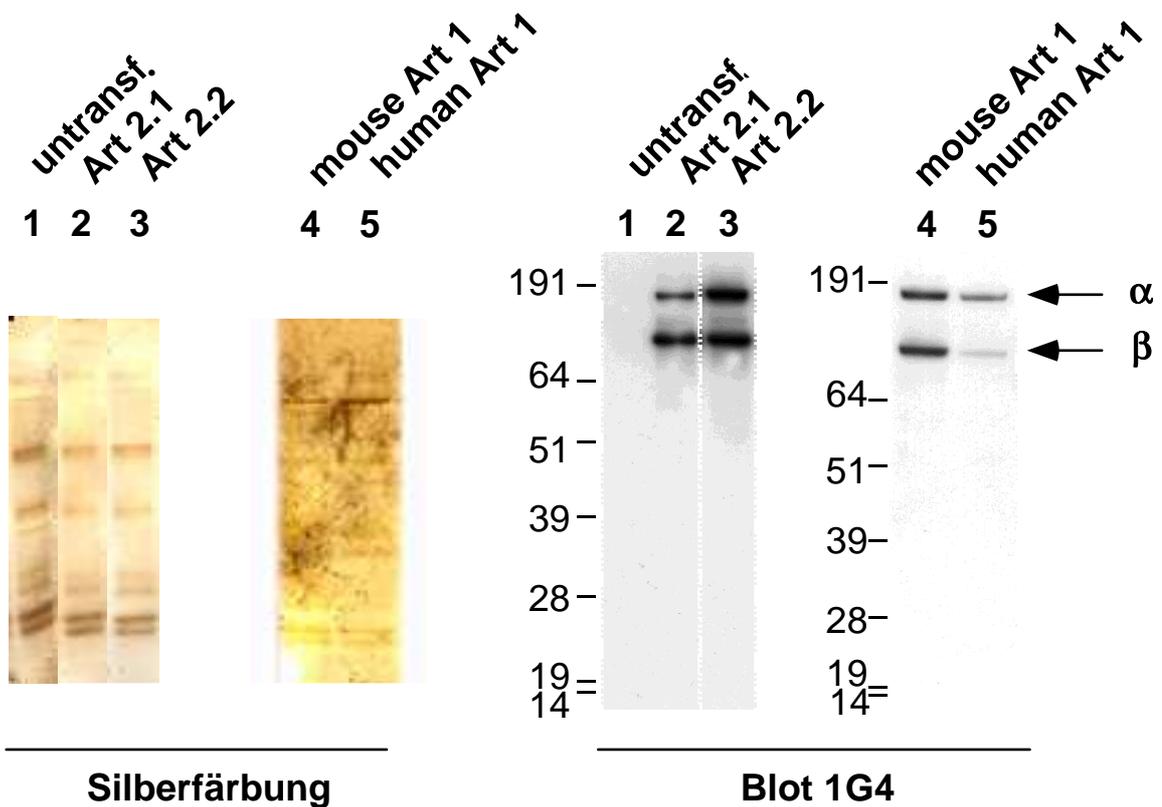


Abbildung 25: ADP-Ribosylierung von LFA-1 durch unterschiedliche ARTs

Verschiedene DC27.10-Transfektanten wurde mit 100 μ M etheno-NAD (mART2.1 und mART2.2) oder 20 μ M etheno-NAD (mART1 und hART1) inkubiert und anschließend lysiert. Nach Immunpräzipitation mit dem monoklonalen anti-LFA-1-Antikörper M17-4 erfolgte die Detektion des Westernblots mit dem 1G4-Antikörper. Die Pfeile markieren die Höhe der α - und β -Kette des etheno-ADP-ribosylierten LFA-1. Links sind die korrespondierenden Silberfärbungen dargestellt. Der gezeigte Vergleich zwischen humanem und Maus ART1 repräsentiert einen von drei Versuchen. Spur 1: Untransfizierte DC27.10-Zellen; Spur 2: DC27.10^{mART2.1}; Spur 3: DC27.10^{mART2.2}; Spur 4: DC27.10^{mART1}; Spur 5: DC27.10^{hART1}

Das hART1 erschien im Vergleich zu mART1 hingegen schwächer modifiziert und es zeigte sich eine stärkere Markierung der α -Kette im Verhältnis zur β -Kette.

Auch CD44 konnte als Zielprotein aller untersuchten Transferasen (mART1, mART2.2, hART1) nachgewiesen werden (Abb. 26), wobei die Banden unterschiedliche Intensitäten zeigten (in zunehmender Stärke: mART1, hART1, mART2.2). Auch hier fällt eine schwächere Modifikation durch hART1 auf, obgleich in der Silberfärbung eine stärkere Proteinbeladung des Gels zu erkennen ist (Abb. 26, Spur 3).

Diese Versuche könnten darauf hinweisen, dass die schwächere Transferaseaktivität von hART1 durch eine geringere Spezifität von hART1 für die Mausproteine LFA-1 und CD44 bedingt ist.

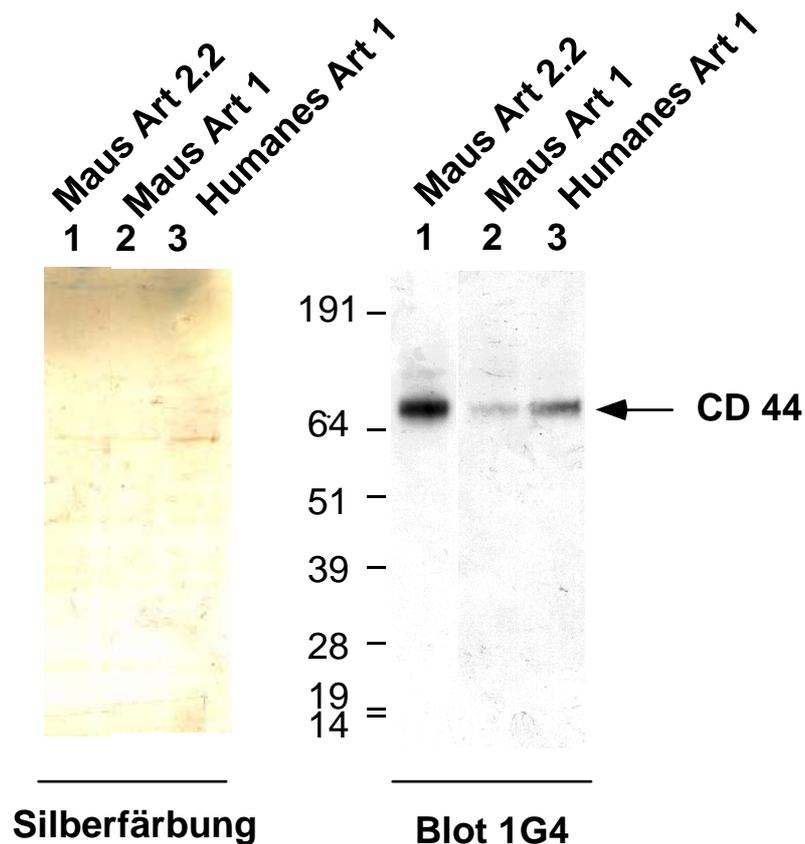


Abbildung 26: ADP-Ribosylierung von CD44 durch unterschiedliche ARTs.

Verschiedene DC27.10-Transfektanten wurden mit 20 μ M etheno-NAD inkubiert und anschließend lysiert. Nach Immunpräzipitation mit einem monoklonalen CD44-spezifischen-Antikörper erfolgte die Detektion des Westernblots mit dem 1G4-Antikörper; Links die korrespondierende Silberfärbung.

4.2.3 ADP-ribosylierung der α -Kette von humanem CD8

Wie in der Einleitung bereits dargestellt, deuteten Ergebnisse von Wang et al. im Maussystem darauf hin, dass sich die TCR-Signaltransduktion durch ADP-Ribosylierung von CD8 hemmen ließ (Wang et al., 1996). Da ART-Aktivität im Kontext des Immunsystems auf menschlichen neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden konnte (Kefalas et al., 1997), erschien es interessant die ADP-Ribosylierung von humanem CD8 zu untersuchen. Abb. 27A zeigt in Spur 1 eine Autoradiographie ^{32}P -NAD behandelter Jurkat^{hART1}-Transfektanten. Nach Kotransfektion mit der α -Kette von humanem CD8 zeigte sich eine weitere Bande bei ca. 30 kDa (Abb. 27A Spur 2), die mit der errechneten Größe von humanem CD8 α übereinstimmte. Eine Immunpräzipitation mit einem CD8 α spezifischem Antikörper nach etheno-NAD-Markierung und 1G4-Westernblotanalyse konnte dieses Ergebnis bestätigen (Abb. 27B, Spur 2).

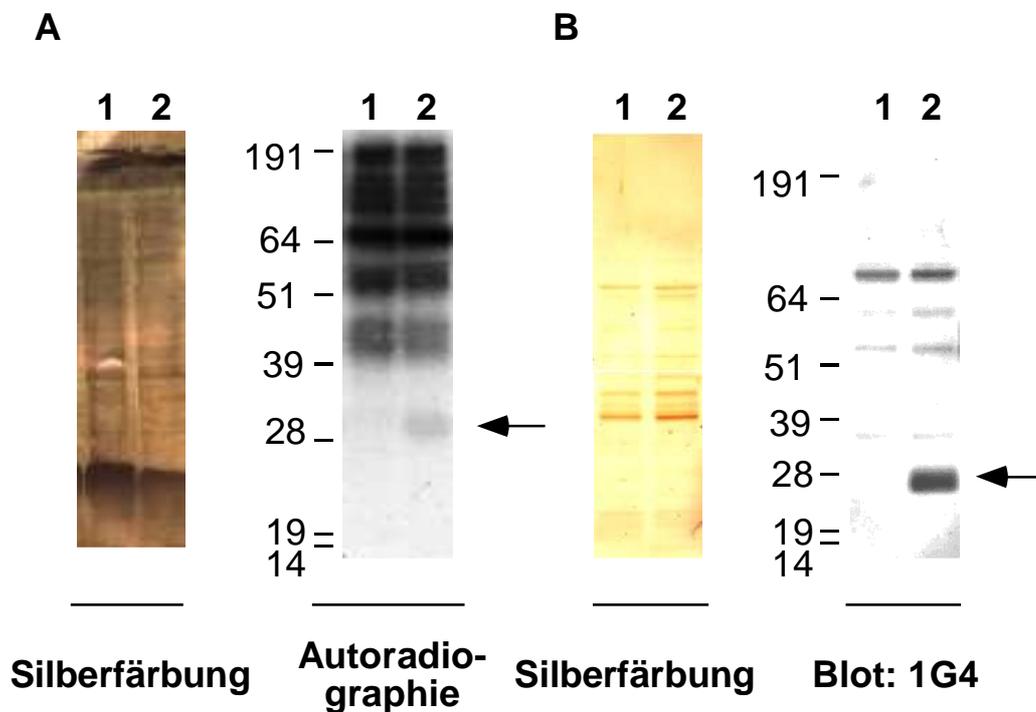


Abbildung 27: ADP-Ribosylierung von CD8-alpha durch hART1

A Jurkat-Zellen wurden transient entweder mit hART1 alleine transfiziert (Spur 1) oder zusätzlich mit der α -Kette von humanem CD8 kotransfiziert (Spur 2), und zwei Tage nach der Transfektion untersucht. Dabei wurden die Zellen mit $10 \mu\text{Ci } ^{32}\text{P}$ -NAD markiert und anschließend lysiert. Rechts

dargestellt ist die Autoradiographie, links die korrespondierende Silberfärbung. **B** Jurkat-Zellen wurden transfiziert wie unter A. Anschließend wurden die Zellen mit 20 μ M etheno-NAD markiert. Immunpräzipitate mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD8 α (Ratte anti-Maus CD8 α -PE) wurden mit dem 1G4-Antikörper detektiert. Spur 1: nur mit hART1 transfizierte Zellen; Spur 2: mit hART1 und CD8 α transfizierte Zellen; li. ist die korrespondierende Silberfärbung dargestellt.

Die α -Kette des humanen CD8 erwies sich somit in vitro als Zielprotein von humanem ART1. Ob es in vivo ebenfalls zu ADP-Ribosylierung von CD8 kommt, und ob dieser Modifikation Bedeutung im Kontext des menschlichen Immunsystems zukommt, müssen zukünftige Experimente zeigen.

4.2.4 Verschiedene ARTs besitzen Auto-ADP-Ribosyltransferaseaktivität

Die Fraktion der GPI-verankerten Proteine konnte durch Inkubation ART exprimierender Zellen mit PI-PLC untersucht werden. Dabei fand sich in den mit ^{32}P -NAD oder etheno-NAD markierten Zellen jeweils eine prominente Bande (siehe Abb. 28A). Mittels anti-Flag spezifischer Detektion im Westernblot konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei diesen Banden um die ADP-Ribosyltransferasen selbst handelte, die auto-ADP-ribosyliert wurden (Abb. 28B). Dabei zeigten die einzelnen Transferasen spezifische Größen: Für mART2.2 ca. 30 kDa, mART2.1 ca. 40 kDa, mART1 ca.45 kDa. Die Transferasen mART2.1 und mART2.2 zeigten deutliche Unterschiede in ihrer tatsächlichen Größe, trotz nur sehr geringfügiger Unterschiede in ihrer anhand der Aminosäure-sequenzen vorhergesagten Größe. Die errechnete Größe betrug ca. 30 kDa und ergibt sich aus 28 kDa für das mART2.2/mART2.1 und 1,2 kDa für den FLAG-tag. Eine mögliche Erklärung könnte in dem unterschiedliche Glykosylierungsverhalten der beiden Transferasen liegen. Interessanterweise zeigte sich in einer Immunpräzipitation mit gegen mART2.2 gerichteten Antikörpern in EL4-Zellen eine andere Größe im Westernblot, nämlich von 45 kDa (Siehe Dissertation Sarah Kahl (kahl, 2002)S.67). Dies könnte dafür sprechen, dass unterschiedliche Zelllinien Unterschiede bei der Glykosylierung von mART2.2 zeigen. Auch Immunpräzipitationen mit dem für mART2.1 und mART2.2 spezifischen monoklonalen Antikörper A53/ALI (Abb. 28C) und mit dem FLAG spezifischen Antikörper M2 (Abb. 28D) konnten diese Ergebnisse bestätigen.

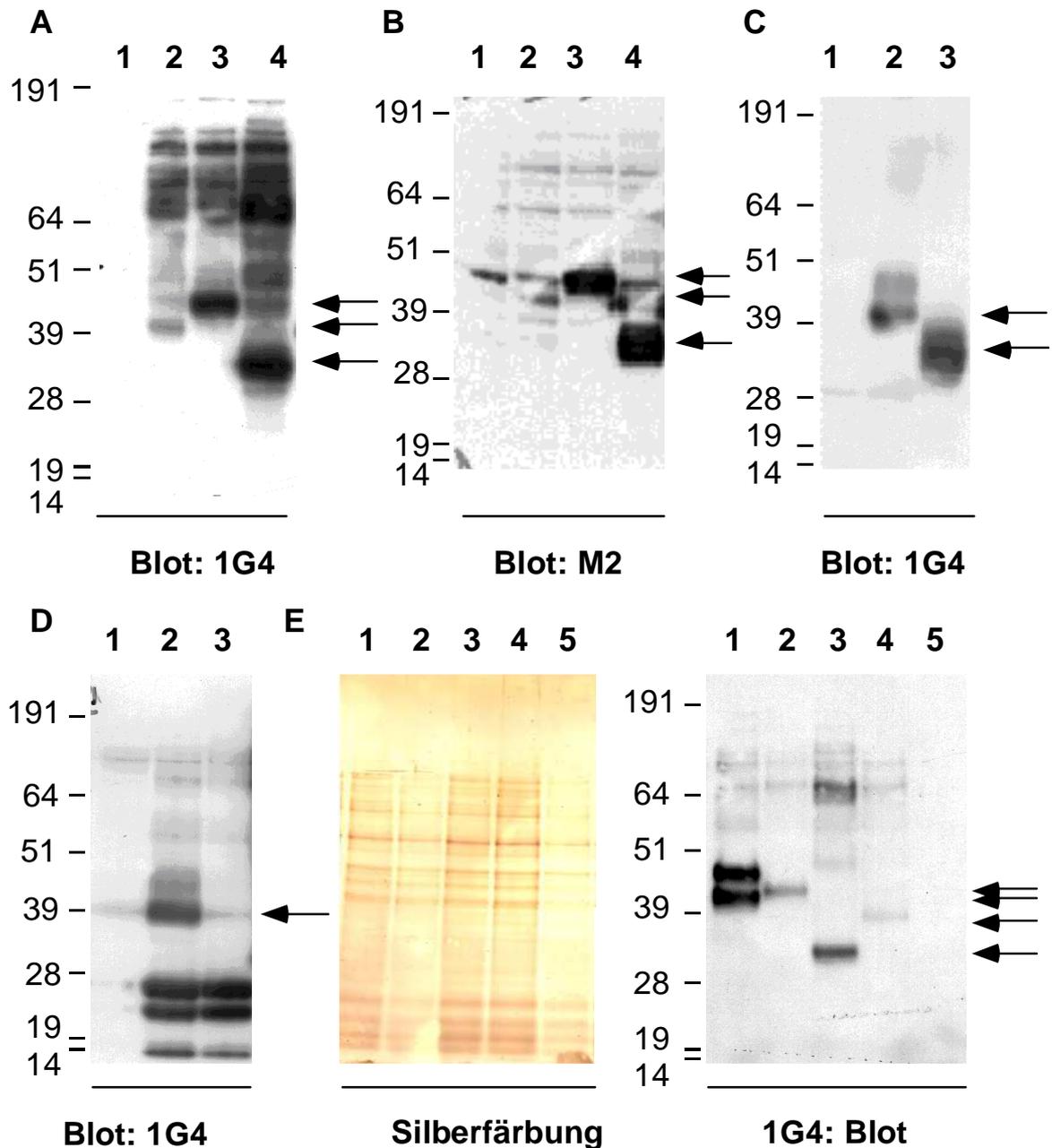


Abbildung 28: Automodifikation von ARTs

A Verschiedene DC27.10-Transfektanten wurden mit 20 μ M etheno-NAD inkubiert (entspricht Abb. 16B.). Anschließend wurden die Zellen mit PI-PLC inkubiert und im 1G4-Westernblot untersucht. Spur 1: untransfiziert; Spur 2: mART2.1; Spur 3: mART1; Spur 4: mART2.2 **B** Der Blot mit den PI-PLC-Überständen aus A wurde gestrippt und mit dem Flag-spezifischen monoklonalen Antikörper M2 detektiert. **C** Es wurden Immunpräzipitationen mit dem für mART2.1 und mART2.2 spezifischen monoklonalen Antikörper A53/ALI durchgeführt. Die Detektion im Westernblot erfolgte mit dem 1G4-Antikörper. Spur 1: DC27.10^{mART2.1} ohne etheno-NAD; Spur 2: DC27.10^{mART2.1} mit etheno-NAD; Spur 3: DC27.10^{mART2.2} mit etheno-NAD. **D** DC27.10^{mART2.1}-Transfektanten wurden mit 20 μ M etheno-NAD markiert und anschließend lysiert. Es erfolgte ein Preclearing mit Protein-G-Sepharose

(Spur 1) und anschließend eine Immunpräzipitation mit dem M2-Antikörper (Spur 2). Der Überstand der ersten Immunpräzipitation wurde anschließend für eine zweite Immunpräzipitation verwendet (Spur 3). **E** Verschiedene DC27.10-Transfektanten wurden in 1% Igepal-Lysepuffer aufgenommen und für 30 Min. auf Eis inkubiert (Standard-Lyse, siehe Material und Methoden). Nach Zentrifugation wurde das Pellet erneut in Lysepuffer resuspendiert und für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Mit den Proben wurde ein 1G4-Westernblot durchgeführt. Spur 1: DC27.10^{hART1}; Spur 2: DC27.10-Zellen^{mART1}; Spur 3: DC27.10-Zellen^{mART2.2}; Spur 4: DC27.10-Zellen^{mART2.1}; Spur 5: DC27.10-Zellen^{mART2.2} ohne etheno-NAD;

Eine weitere Methode zur separaten Untersuchung der Fraktionierung der GPI-verankerten Proteine stellt die sequentielle Lyse dar. Dabei wurden die Zellen zuerst 30 Minuten bei 4°C auf Eis lysiert. Anschließend wurde das Pellet resuspendiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die in den Rafts lokalisierten, GPI-verankerten ARTs gehen zum großen Teil durch das 4°C-Lyseverfahren nicht in Lösung. Erst nach dem zweiten Schritt, der Resuspendierung bei 37°C, werden die GPI-verankerten Proteine solubilisiert und die verschiedenen ARTs erscheinen in dieser Fraktion (Abb. 28E). Dabei fällt auf, dass in der Spur der hART1-Transfektanten im Gegensatz zum mART1 zwei Banden bei ca. 40 und 45 kDa erscheinen. Die zweite Bande könnte möglicherweise einem anders glykosyliertem hART1 entsprechen.

In dem analogen Experiment in Jurkat^{hART1}-Transfektanten zeigte sich eine 40 kDa große breit erscheinende Bande, die möglicherweise ebenfalls der hier beobachteten Doppelbande entsprechen könnte (siehe Abb. 17). Bei dem in diesem Versuch verwendeten Konstrukt (pTRE, siehe Material und Methoden) in den Jurkat-Zellen wurde kein Flag-Tag verwendet, so dass es unwahrscheinlich erscheint, dass die Automodifikation in Zusammenhang mit dem Flag-Tag steht.

Ob die Auto-ADP-Ribosylierung der eukaryotischen ARTs in vivo vorkommt und ob die Enzymfunktion dadurch beeinträchtigt wird, wie z.B. bei bestimmten Kinasen beschrieben, ist bisher ungeklärt.

4.2.5 Identifizierung neuer Zielproteine mittels Nano-Elektrospray-Massenspektroskopie

Ziel des Experimentes war es, durch Anreicherung etheno-ADP-ribosylierter Zielproteine in ausreichender Quantität und Qualität eine massenspektroskopische Bestimmung von ART-Zielproteinen zu erreichen. Dazu wurden $1,2 \cdot 10^9$ murine DC27.10^{ART2.2}-Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit 20µM etheno-NAD inkubiert und in 1% Igepal auf Eis lysiert. Nach Immunpräzipitation mit dem 1G4-Antikörper und anschließender SDS-Page und Proteinfärbung im Gel (Coomassie) wurden fünf Banden aus dem Gel ausgeschnitten.

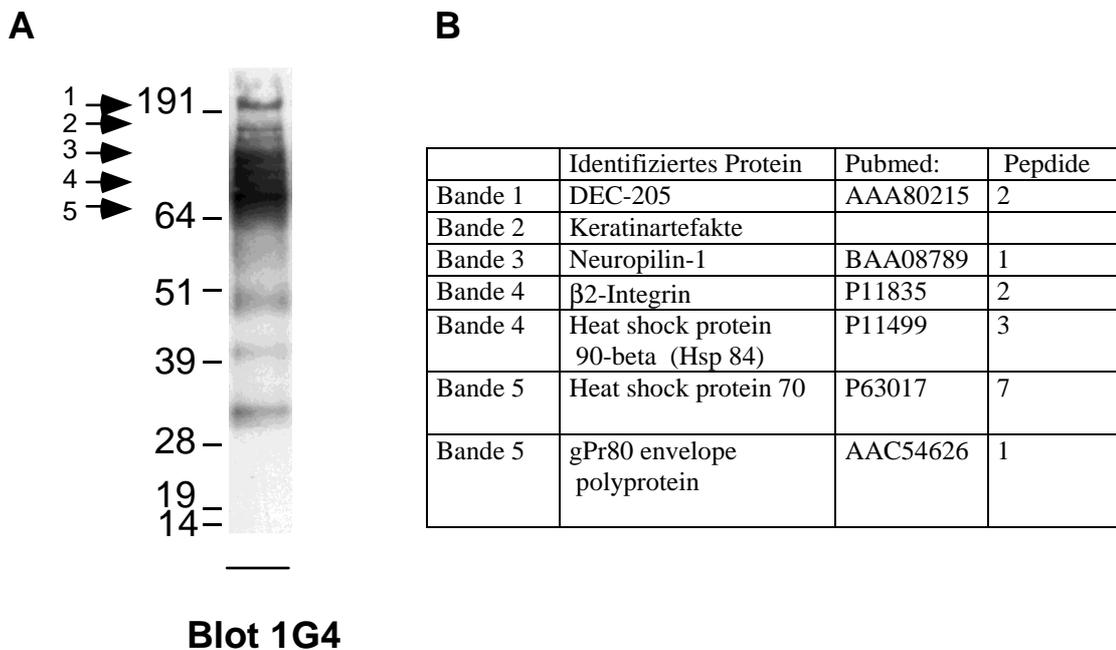


Abbildung 29: Massenspektroskopische Analyse von 1G4-Immunpräzipitaten

$1,2 \cdot 10^9$ -DC27.10^{ART2.2}-Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C mit 20µM etheno-NAD inkubiert und in 1% Igepal auf Eis lysiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit dem 1G4-Antikörper (50 µg an Aminolink-Matrix gekoppeltem 1G4-Antikörper) durchgeführt. Nach SDS-Page und Proteinfärbung (Coomassie) wurden fünf Banden direkt aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurden ein in Gel-Trypsin-Verdau und eine Nano-Elektrospray-Massenspektroskopie durchgeführt (siehe Material und Methoden). **A** Dargestellt ist ein Aliquot der für die Massenspektroskopie verwendeten Proben, welches auf dem selben Gel parallel dazu im Westernblot mit 1G4 immundetektirt wurde. Die Höhe der korrespondierenden aus dem Coomassie-Gel ausgeschnittenen Banden ist durch Pfeile auf dem Westernblot dargestellt. **B** Links sind die nach Proteindatenbankrecherche identifizierten Proteine, rechts die Anzahl der per Massenspektroskopie gefundenen Peptide, tabellarisch dargestellt.

In Kooperation mit dem Institut für Zellbiochemie des UKEs wurde eine Nano-Elektrospray-Massenspektroskopie durchgeführt. Abb. 29A zeigt einen parallel durchgeführten Immunoblot von einem Aliquot der für die Massenspektroskopie verwendeten Proben mit dem 1G4-Antikörper. Die Höhe der aus dem Coomasiegel ausgeschnittenen Proteinbanden ist durch Pfeile in diesem Immunoblot markiert. Anhand der in der Massenspektrometrie detektierten Oligopeptide konnten mittels Suche in der Proteindatenbank sechs Proteine identifiziert werden: Bande 1: DEC-205; Bande 3: Neuropilin-1; Bande 4: das bereits als Zielprotein bekannte β_2 -Integrin (CD18) und Hsp 90; Bande 5: Hsp 70 und das gPr80 envelope protein des Mäuse-Leukämie-Virus (MuLV). In Abb. 30 sind die durch MS/MS-Massenspektroskopie identifizierten Oligopeptide in das Gesamtprotein jeweils fett markiert eingetragen. Von den sechs identifizierten Proteinen entsprachen nur vier Proteine Zelloberflächenproteinen, die als mögliche Zielproteine der ARTs in Betracht kommen: DEC-205, Neuropilin-1, β_2 -Integrin und das virale envelope protein. Das β_2 -Integrin aus dem LFA-1 (siehe Abb. 24), kann als Positivkontrolle der Methode angesehen werden. Die übrigen intrazellulären Proteine könnten in Komplexen mit Zielproteinen der ARTs vorgelegen haben und so copräzipitiert worden sein. Beispielsweise wurde ein mit dem P2X7-Rezeptor assoziierter Proteinkomplex beschrieben, der unter anderem β_2 -Integrin, Hsp 70 und Hsp 90 enthält (Kim et al., 2001). Die Möglichkeit der ADP-Ribosylierung intrazellulärer Proteine nach der Lyse, ist unter den gewählten Versuchsbedingungen sehr unwahrscheinlich, da die Zellen vor der Lyse mehrmals gewaschen wurden und somit das Substrat der ARTs etheno-NAD nach der Lyse nicht vorhanden war.

Da sich unter diesen Bedingungen nicht alle bisher bekannten Zielproteine (z.B. CD45, CD 44, CD43, P2X7) identifizieren ließen, erscheint es sinnvoll, die Methodik weiter zu optimieren, um andere mögliche Zielproteine zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche durchgeführt, die Bindung etheno-ADP-ribosylierter Proteine an eine 1G4-Sepharose-Säule mit etheno-Adenosin zu eluieren, um Zielproteine anzureichern. Eine hinreichende Anreicherung für eine massenspektroskopische Auswertung gelang hierdurch jedoch nicht.

DEC-205

1 mrtgrvtpgl aagllllllr sfglvepses sgndpftivh entgkciqpl sdwvvaqdc
 61 gtnnmlwkvw sqhrlfhles qkclgllditk atdnlrnfsc dstvmlwwkc ehhslytaa
 121 yrlalkdgya vantntsdvw kkggseenlc aqpyheytr dgnsygrpce fpfligetwy
 181 hdcihdedhs gpwcattlsy eydqkwgicl lpesgcegnw ekneqigscy qfnngqeilsw
 241 keayvscnq gadllsihsa aelayitgke diarlvwgl nqlysargwe wsdfrplkfl
 301 nwdpgtpvap viggsscarm dtesglwqsv scesqgpyvc kkplnntlel pdvwttdth
 361 chvgwlpnng fcyllaness swdaahlkck afgadlismh sladvevvvt klhngdvkke
 421 iwtglkntns palfqwsdgt evltlywnen epsvpfnktp ncvsylgklg qkwvqscck
 481 lryvckkkge itkdaesdkl cppdegwkrh getcykiyek eapfgtncnl titsrfegef
 541 lnymnknydk slrkyfwtgl rdpdsrgeys wavaqgvkqa vtfsnwnfle paspggcvam
 601 stgkltgkwe vkncrsfral sickkvsepq epeeaapkpdp dpcpegwhf psslsykvf
 661 hierivrkrn weeaerfca lgahlpsfsr reeikdfvhl lkdqfsgqrw lwiglkrsp
 721 dlqgswwsd rtpvsavmme pefqgdfdir dcaaiklvldv pwrwrwhlye lwiglrwtpf
 781 acdaklewwc qipkgstpqm pdwynpertg ihgppviieg seywfvadph lnyeaavlyc
 841 asnhsflati tsftglkaik nklanisgee qkwwvktse pidryflgsr rrlwhhfpmt
 901 fgdeclhmsa ktwlvdlskr adcnaklpfi cerynvssle kyspdpaakv qctekwipf
 961 nkcfklvnsq **pvtfsqasgi chsyggtlps vlsrgeqdfi** isllpemeas lwiglrwtay
 1021 erinrwtndr eltysnfhpl lvgrrlsipt nffddeshfh calilnlkks pltgtwnfts
 1081 cserhslslc qkysetedgq pwentsktvk ylnnlykiis kpltwhgalk ecmkekmlrv
 1141 sitdpyqqaf lavqatlrns sfwiglssqd delnfgwsdg krlqfnsnwg sneqlddcvi
 1201 ldtgdgfwkta dcdnqpgai cyypgnetee evraldtakc pspvqstpwi pfgnscynfm
 1261 itnrhktvt peevqstcek lhpkaahlsi rneeentfvv eqllyfnyia swvmlgitye
 1321 nnslmwfdkt alsythwrtg rptvknkfl aglstdgfwd iqsfnvieet lhfyqhsisa
 1381 kkiemvdyed khngtlpqfi pykdgvsvi qkkvtwyeal nacsqsggel asvhnpgkl
 1441 flevdivr **dg fplwvlgssh dgsessfews dgrafdyvpw** qslqspgdcv vlypkgiwr
 1501 ekclsvkdga icykptkdkk lifhvksskc pvakrdgppw vqyggghcyas dqvlhsfsea
 1561 kvvcqeldhs atvvtiaden enkfvsrlmr enynitmrwv lglsqhsldq sswldgldv
 1621 tfvkwenktk dgdgkcsili asnetwrkvh csrgyaravc kiplspdytg iaillfavlc
 1681 lglislaiwf llqrshirwt gfsvryehg tnedevmlps fhd

Neuropilin-1

1 mergipllca tlalalalag afrsdckcgt ikienpgylt spgyphsyhp sekcewliqa
 61 pepyqriiin fnphfdledr dkydyvevi dgeneggrlw **gkfcgkiaps pvvssgpfll**
 121 **ikfvsdyeth** gagfsiryei fkrqpecsqn ytaptgviks pgfpekyunc lectyifap
 181 kmseiilefe sfdlegdsnp pggmfcrydr leiwdgfpev gphigrycqq ktpgrirsss
 241 gvlsmvfytd saiakegfsa nysvlqssis edfkcmalg mesgeihsdq itassqygt
 301 wsversrlny pengwtpged sykewiqvdl gllrfvtavg tggaisketk kkyvkytrv
 361 disngedwi slkegnkaii fqgntnptdv vlqvfskpli trfvrikpvs wetgismrfe
 421 vvgckitdyp csgmlgmvsq lisdsgitas nqadrnwmppe nirlvtstrtg walppsphpy
 481 tnewlqvdlg dekiivrgvii qgkghrenkv fmrkfkiays nngsdwktim ddskrkaksf
 541 egnnnydtpe lrtfslplstr firiyperat hsglglrmel lgceveapta gpttpngnpv
 601 hecdddqanc hsgtgddfql tggttvlate kptiidstiq sefptygfnc efgwshktf
 661 chwehdshaq lrsvltskt gpiqdhtgdg nfiysqaden qkgkvarlvsv pvvysqssah
 721 cmtfwhmsq shvgtlrvkl ryqkpeeydq lvwmvvhqg dhwkegrvll hkslklyqvi
 781 fegeigkgnl ggiavddisi nnhisqedca kptdldknt eikidetgst pygegeged
 841 knisrkgpvn lktldpilit iiamsalgv lgvacgvvly cacwhngmse rnlsalenyn
 901 felvdgvklk kdklnpqsny sea

 β 2-Integrin

1 mlglrpslll alaglfflgs avsqectkyk vsscrcciqs gpgcswcql nftgpgpeds
 61 lrcdtraql lkgcpaddim dprsiangep dqrgrkqls pqkvtlylrp gqaaafnvtf
 121 rragypid l ylmldlsysm lddlennvkl **ggdlqlalne itesgrigfg** sfvdkvtlplf
 181 vnthpeklrn pcnkekacq pfafrhvlk ltdnsnqfqt evgkqlisgn ldapegglada
 241 imqvaacpee igwrntrll vfatddghf agdgklgail tpdnrgchle dnmykrnef
 301 dypsvgqlah klsestniqpi favtkkmvkt yeklteiipk **savgelsdds snvvqlikna**
 361 yyklssrvfl dhstlpdtlk vtydsfcsng assigksrgd cdgvqinnpv tfqvkvmase
 421 ciqeqsfvir algftdtvtv qvrpqceqc rdqsreqslc gkgvmecegi crcesyigk
 481 nceqqtqgrs sqelerncrk dnssivcsgl gdcicgqvc htsdvpnkei fgqycecdnv
 541 ncerynsqvc ggsdrsgscnc gkscckpye gsacqqrst tgclnarlve csgrghcqn
 601 rcicdegyqp pmcedcpsc shcrdnhtsc aeclfkdkgp fekncsvqca gmtlqtiplk
 661 kkpckerdse gcwitytlq kdgrniynih vedslecvkg pnvaaivggt vvgvligvl
 721 llviwkalh ltdlireyrrf ekeklksqwn ndnplfksat ttvmpkfae s

Heat-shock protein hsp84 (HSP90)

1 mpeevhhgee evetfafqae iaqlmsliin tfysnkeifl relisnasda ldkiryeslt
61 dpskldsgke lkidiipnpg ertltlvdtg igmtk**adlin** **nlgtiaksgt** kafmealqag
121 adismigqfg vgfysaylva ekvvvitkhn ddeqyawess aggsftvrad hgepigrgtk
181 vilhkedqt eyleerrvke vvkhsqfig ypitlyleke rekeisdea eeekgeeee
241 dkedeeekpi edvgsdeedd sgkdkkkktk kikekyidqe elnktkpiwt rnpdditqee
301 ygefysltn dwedhlavkh fsvegglefr allfiprrap fdlfenkkkk nniklyvrrv
361 fimdsdeli peylnfir**gv** **vdse****dlplni** **sremlqgs**ki lkvirknivk kclelfsela
421 edkenykkfy eafsknlklg ihedstnrrr lsellryhts qsgdemtsls eyvsrmketq
481 ksiyyitges keqvanpafv ervrkrgefvy vymtepidey cvqqlkefdg kslsvstkeg
541 lelpedeeek kkmeeskak**f** **enlcklmkei** ldkkvekvti snrlvssppc ivtstygwta
601 nmerimkaqa lrdnstmgym makkhleinp dhpivetlrq kaeadkndka vkdlvllfe
661 tallssgfs l edpqtshnri yrmiklglgi dedevtaeep saavpdeipp legdedaspm
721 eevd

Heat shock cognat 70 kDa protein (HSP 70)

1 mskgpavgid lgttyscvgv fqhgkveiia ndqgnrt**tps** **yvaftdterl** igdaaknqva
61 mnptntvfda krligrrfdd avvqsdmkhw pfmvndagr pkvqvveykge **tksfypeevs**
121 **smvltk**mk**kei** aeayl**gktvt** **navvtvpayf** **ndsqrqatk**d agtiaglnvl **riineptaaa**
181 **iaaygldk**kv**g** aernvlifdl gggtfdvsil tiedgifevk stagdthlgg edfdnrmvnh
241 fiaefkrkhk kdisenkrav **rrlrtacera** krtlsstqa sieidslyeg idfytsitra
301 **rfeelnadlf** rgtldpveka lrdakldksq ihdivlvggs tripkiq**kl1** **qdfngkeln**
361 **ksin**pdeava ygaavqaail sgdkseenvqd lllldvtp**ls** lgietaggv**m** tvlikrntti
421 ptkqtq**ftt** ysdnqpgvli qvyegeramt kdnnllgkfe ltgippaprg vqgievtfdi
481 dangiln**vs**a vdkstgkenk ititndkgrl skediermvq eaekykaede kqrdkvsskn
541 slesyafnmk atvedeklqg kindedkqki ldkcneiisw ldknqtaeke efehqqkele
601 kvcnpiitkl yqsagmpgg mppgfpggga ppsggassgp tieevd

gPr80 envelope polyprotein

1 vptgqggpre gycgkwg**cet** tgqaywkps**s** swdlislkrr ntpqnqgpcy dssavssdik
61 gatpgg**rc**np lvleftdag**g** kaswdgpk**vw** glrlyrstgt dpvtrfsltr qvlnigprvp
121 igpnpvitd**g** lppsrpvqim lprppqpppp gaastvpeta ppsqqpgtg**d** rllnlvdgay
181 qalnltspd**k** tqecwlclva gppyltegva vlgtyshnts apancsvasq **hkltlsevtg**
241 **qglcvgavpk** thqalcnttg ktsdgsyyla appgpiwacn tgltpclstt vldlttdy**cv**
301 lvelwpkvty hspgyvygqf erktykr

Abbildung 30: Aminosäuresequenz der durch Nano-Elektrospray-Massenspektroskopie identifizierten Proteine; fett markiert sind dabei die durch Massenspektroskopie identifizierten Oligopeptide

4.2.6 Bestätigung von DEC-205 als Zielprotein von ARTs mittels Immunpräzipitation

Eine FACS-Anfärbung mit einem DEC-205-spezifischen Antiserum zeigte, dass DEC-205 auf DC27.10-Zellen zu 100% exprimiert wird (Abb. 31B). Durch Immunpräzipitation mit einem DEC-205-spezifischen Antiserum und anschließender Immundetektion mit dem 1G4-Antikörper aus DC27.10-^{mART1}-Transfektanten zeigte sich eine 200 kDa große Bande, die der beschriebenen molekularen Größe des DEC-205 entsprach. (Abb. 31A, Spur 2). In Spur 1 erkennt man im 1G4-Immunpräzipitat eine abgrenzbare Bande in korrespondierender Größe. Neuropilin-1 konnte ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe als Zielprotein der ARTs bestätigt werden (Daten nicht dargestellt). Die Bestätigung für das envelope protein als Zielprotein der ARTs steht noch aus.

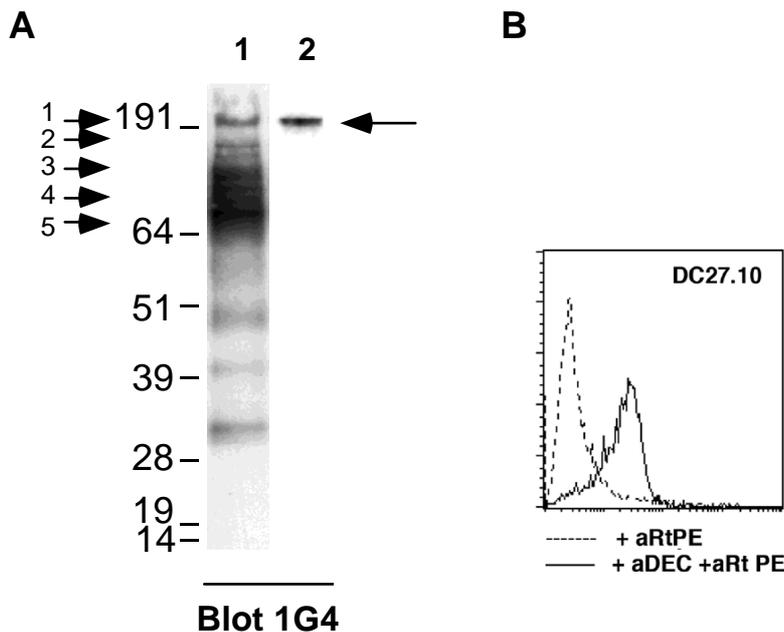


Abbildung 31: Bestätigung von DEC-205 als Zielprotein der ARTs

DC27.10-^{mART1}-Transfektanten wurden mit 20 μ M etheno-NAD und 1mM ADPR inkubiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit einem DEC-205 spezifischen Hybridom-Überstand durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit 1G4. **A** Spur 1: entspricht Abb. 29A, Spur 2: Immunpräzipitation mit einem DEC-205 spezifischen Hybridom-Überstand aus DC27.10-^{mART1}-Transfektanten; **B** FACS-Darstellung der Expression von DEC-205 auf DC27.10-Zellen. Die gestrichelte Linie entspricht einer Negativkontrolle (nur Zweitantikörper). Die durchgezogene Linie zeigt die Anfärbung mit dem primären Antikörper gegen DEC-205 und dem sekundären PE konjugierten Zweitantikörper

Weitere Experimente sind nötig, um zu klären, ob diese Proteine auch *in vivo* ADP-ribosyliert werden, ob es dadurch zur Beeinflussung wichtiger zellulärer Funktionen kommt, oder ob bereits beschriebene Effekte der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächen-Proteinen durch die Modifikation dieser Proteine erklärt werden können. Es wäre des Weiteren interessant zu untersuchen, ob es auf dendritischen Zellen *in vivo* im Rahmen der immunologischen Synapse zu einer ADP-Ribosylierung von DEC-205 und Neuropilin-1 *in trans* kommt. Des Weiteren erscheinen funktionelle Untersuchungen über den Einfluss der ADP-Ribosylierung des Neuropilins auf T-Zellen sehr erfolgversprechend.

4.3 Interaktionen zwischen ADP-Ribosylierung und Tyrosin-phosphorylierung

4.3.1 Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinasen in DC27.10-Zellen

Eine Immunpräzipitation von DC27.10^{mART2.1}-Transfektanten mit dem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper 4G10 und anschließende Westernblotdetektion mit dem 1G4 Antikörper zeigte eine Bande bei ca 80 kDa (Abb. 32B, Spur 1). Nach Behandlung der Zellen mit dem Phosphatase-Inhibitor Natrium-Ortho-Vanadat (Pervanadat) kam es zu starker Anreicherung dieser Bande und es erschienen zwei weitere Banden bei ca. 50 kDa, sowie bei ca. 83 kDa (Abb. 32B, Spur 2). Eine Immunpräzipitation mit dem 1G4-Antikörper und anschließende Detektion mit dem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper RC-20 zeigte eine Bande bei ca. 80 kDa (Abb. 32C, Spur 2) nach Pervanadatbehandlung.

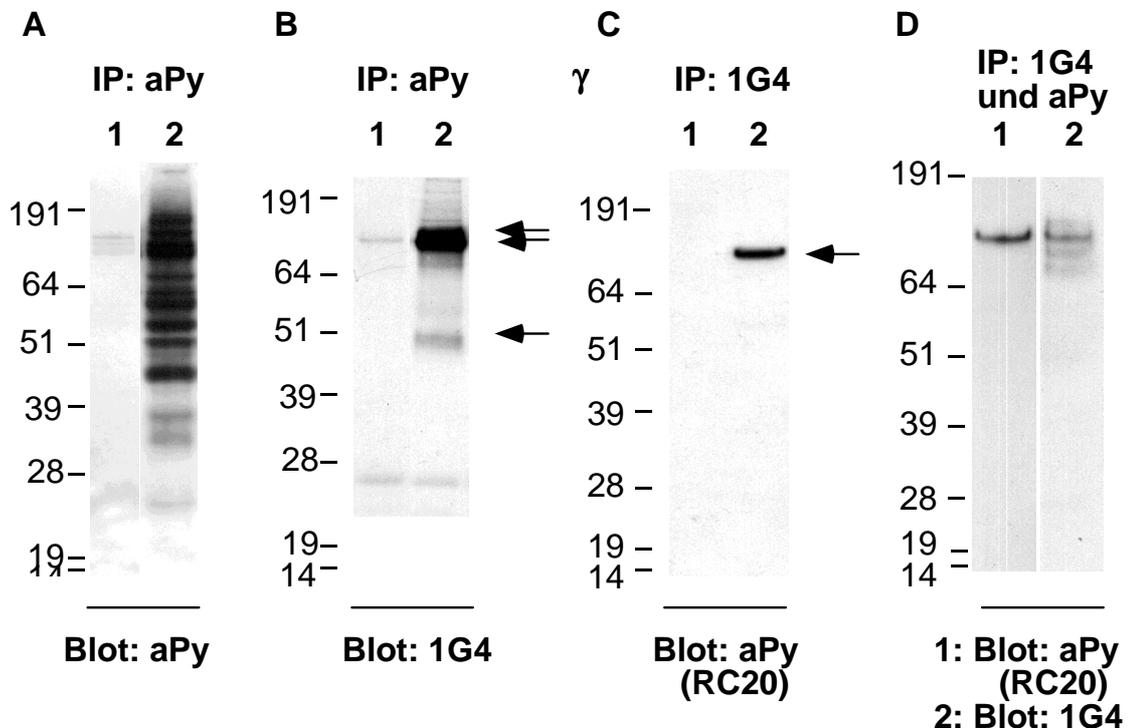


Abbildung 32: Interaktionen zwischen ARTs und Tyrosinkinasen in DC27.10-Zellen
DC27.10^{mART2.1}-Transfektanten wurden mit 20 μ M etheno-NAD inkubiert und anschließend mit Pervanadat behandelt. A - C: Spur 1 zeigt jeweils ohne, Spur 2 zeigt jeweils mit Pervanadat

behandelte Zellen. **A** Immunpräzipitation und Detektion mit dem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper 4G10; **B** Immunpräzipitation wie in A und Immundetektion mit dem 1G4-Antikörper. Bei den Banden um ca. 25 kDa handelt es sich um unspezifische Hintergrundbanden, die auch in untransfizierten Kontrollen auftauchen. Die Pfeile markieren ca. 80 kDa, ca. 83 kDa ca. 50 kDa große Proteine. **C** Immunpräzipitation mit dem 1G4-Antikörper und Immundetektion mit dem monoklonalen Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper RC20 (Verdünnung: 1 :2500). **D** 1G4-Immunpräzipitate wurden in SDS- und DTT-haltigem Puffer (siehe Material und Methoden) für 6 min bei 90° gekocht und anschließend mit Lysepuffer verdünnt. Danach wurde eine zweite Immunpräzipitation mit dem 4G10-Antikörper durchgeführt. Diese 4G10-Präzipitate wurden in Spur 1 und 2 der SDS-PAGE geladen. Spur 1 zeigt eine Immundetektion mit dem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper RC20; Spur 2 zeigt eine Immundetektion mit 1G4.

In einer doppelten Immunpräzipitation sowohl mit dem 1G4-Antikörper als auch mit dem 4G10-Antikörper nach Vorbehandlung der Zellen mit etheno-NAD und Pervanadat zeigte sich im 1G4- und im RC20-Westernblot (Abb. 32D, Spur 1 und 2) eine Bande bei ca. 80 kDa. Diese Befunde deuten auf die Existenz eines ca. 80 kDa großen Transmembranproteins auf DC27.10-Zellen hin, welches extrazellulär von ARTs und intrazellulär von Tyrosin-Kinasen modifiziert wird. Bei den Banden um ca. 50 kDa und 83 kDa (Abb. 32B, Spur 2) könnte es sich um ADP-ribosylierte Proteine handeln, die mit Tyrosin-phosphorylierten Protein interagieren und deshalb vom 4G10-Antikörper copräzipitiert wurden.

Abb. 33 gibt einen schematischen Überblick über die verschiedenen Interaktionspartner von ARTs und Tyrosinkinasen in DC2710-Zellen.

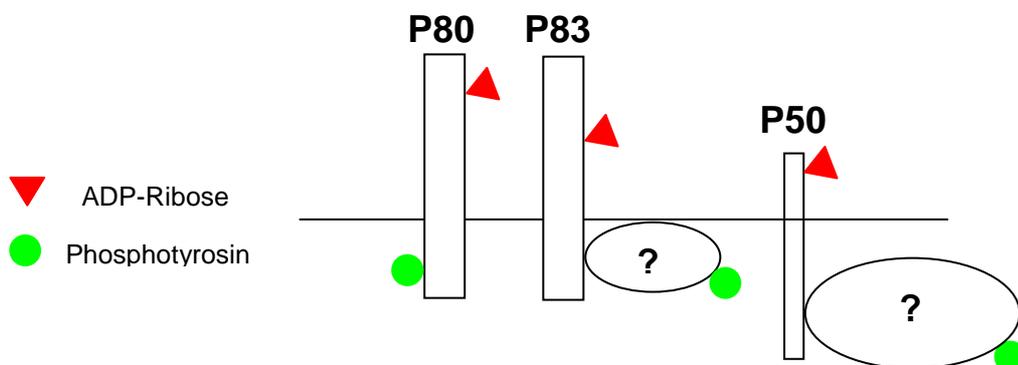


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinasen in DC27.10-Zellen

4.3.2 Etheno-ADP-Ribosylierung des unbekannten 80 kDa großen Proteins (p80) durch unterschiedliche ARTs

Alle hier untersuchten Transferasen zeigten eine Modifikation des 80 kDa großen Proteins (Abb. 34). In hART1- und mArt1-Transfektanten konnte die auch schon beim mArt2.1 beobachteten Bande bei 83 kDa (Abb. 34 B, Spur 2 und 4), die 50 kDa-Bande ließ sich hingegen nur in den hART1-Transfektanten nachweisen. In der humanen Zelllinie Jurkat fanden sich nach transients Transfektion von hART1 zwei Banden bei ca. 80 und 90 kDa (Abb. 34C). Auf menschlichen Zellen könnte das unbekannten p80 somit ebenfalls vorhanden zu sein.

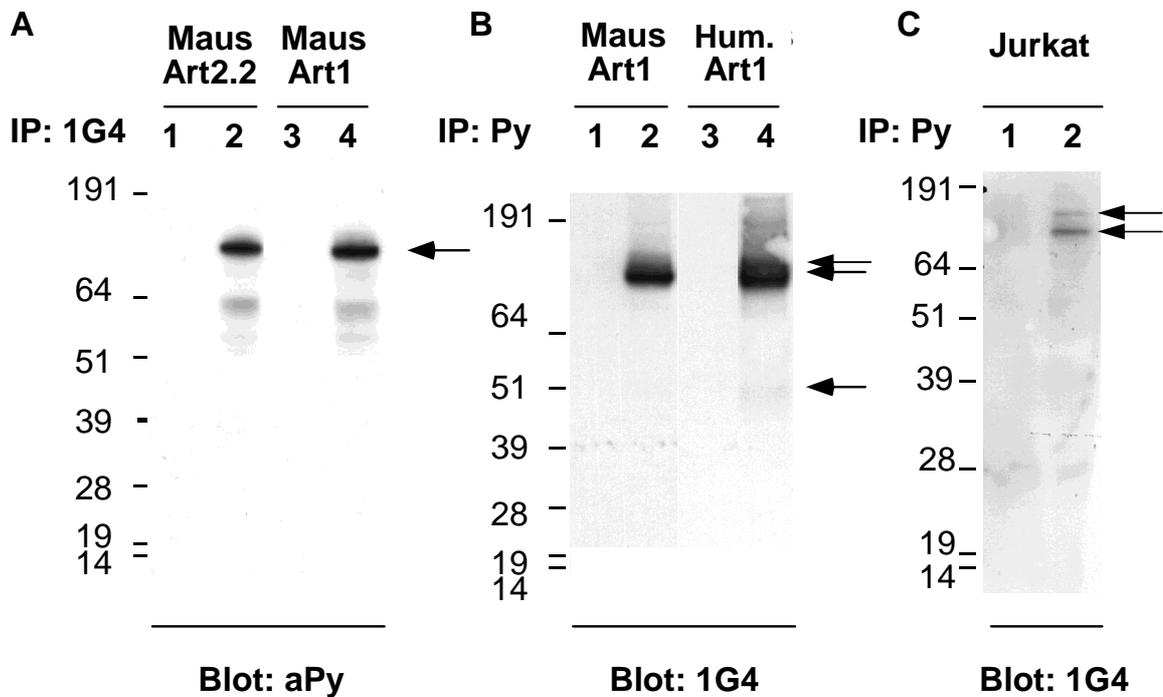


Abbildung 34: ADP-Ribosylierung des 80 kDa großen Proteins durch unterschiedliche ARTs
A,B. DC27.10^{mART2.2}-, DC27.10^{mART1}- und DC27.10^{hART1}-Transfektanten wurden mit 20µM etheno-NAD markiert und anschließend mit Natrium-Ortho-Vanadat stimuliert. Die Spuren 1 und 3 zeigen jeweils unstimulierte, die Spuren 2 und 4 jeweils mit Natrium-Ortho-Vanadat stimulierte Zellen.
A. Immunpräzipitation mit dem 1G4-Antikörper und Immundetektion mit dem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper. Der Pfeil markieren das ca. 80 kDa große Protein **B.** Immunpräzipitation mit dem 4G10-Antikörper und Immundetektion mit dem 1G4-Antikörper. Pfeile markieren das 80 kDa große Protein, sowie die ca. 83 kDa und 50 kDa großen Proteine. **C.** Jurkat-Zellen wurden transient mit hART1 transfiziert und am Tag zwei untersucht. Die etheno-NAD-Behandlung erfolgte mit 20µM für 30 Min. bei 37°C. Es wurde eine Immunpräzipitation mit dem 4G10-Antikörper und Immundetektion mit dem 1G4-Antikörper durchgeführt. Spur 1: hART1-Transfektanten ohne Pervanadat; Spur 2: hART1-Transfektanten mit Vanadat.

4.3.3 Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinase in primären Maus-Lymphknoten-Zellen

Eine wichtige Fragestellung war, ob sich diese an Zellkulturzellen durchgeführten Beobachtungen auch auf primäre T-Zellen übertragen ließen. In B-Zell-depletierten C57BL/6-Maus-Lymphknoten zellen zeigte sich nach Immunpräzipitation mit dem 1G4-Antikörper und Immundetektion mit dem RC-20-Antikörper ohne Stimulation eine Bande bei ca. 55 kDa (Abb. 35A, Spur 1). Nach Stimulation der Zellen mit PMA (Abb. 35A, Spur 2) und PMA/Ionomycin (Abb. 35A, Spur 3) zeigten sich eine weitere Banden bei ca. 70 kDa. Nach Stimulation der Zellen mit anti-CD3-Antikörpern ließen sich zwei zusätzliche Banden bei ca. 64 und 80 kDa erkennen und es kam zu einer stärkeren Markierung der Bande bei 70 kDa (Abb. 35A, Spur 4). Nach Behandlung der Zellen mit Pervanadat zeigte sich eine starke Anreicherung der Banden um 64 und 80 kDa, es zeigte sich jedoch keine Bande mehr bei 70 kDa (Abb. 35A, Spur 5).

Bei der Bande um 55 kDa handelt es sich höchstwahrscheinlich nicht um die schwere Antikörperkette des präzipitierenden Antikörpers, da der detektierende RC20-Antikörper direkt an Peroxidase konjugiert war. Das p55 scheint ein konstitutiv phosphoryliertes Protein zu repräsentieren, welches weder durch T-Zell-Stimulation noch durch Phosphatase-Aktivität beeinflusst wird. Ein möglicher Kandidat für das p55 wäre z.B die Phosphotyrosinkinase Lck. Eine Interaktion zwischen einem unbekanntem ADP-ribosylierten Protein p40 und Lck wurde bereits von Wang et al. 1996 beschrieben (Wang et al., 1996). Die in den 4G10-Präzipitaten gefundene Bande um 40 kDa könnte diesem p40 möglicherweise entsprechen. Ein Kandidat für das p40 wäre CD8, für das eine Interaktion mit Lck beschrieben ist.

Der gleiche Versuch wurde an Balb C Mäusen durchgeführt. Es zeigte sich dabei ein ähnliches Bandenmuster. In unstimulierten Zellen (Abb. 35B, Spur 1) zeigte sich wie in den C57BL/6-Zellen eine Bande bei ca 55 kDa. Daneben zeigte sich jedoch auch eine Bande bei ca. 90 kDa, die nur in den ersten drei Spuren erscheint und höchstwahrscheinlich eher als unspezifisch zu werten ist. Nach Stimulation mit PMA (Abb. 35B, Spur 2), PMA/Ionomycin (Abb. 35B, Spur 3) und anti-CD3 (Abb. 35B, Spur 4) erschienen weitere Banden bei ca. 64 und 70 kDa.

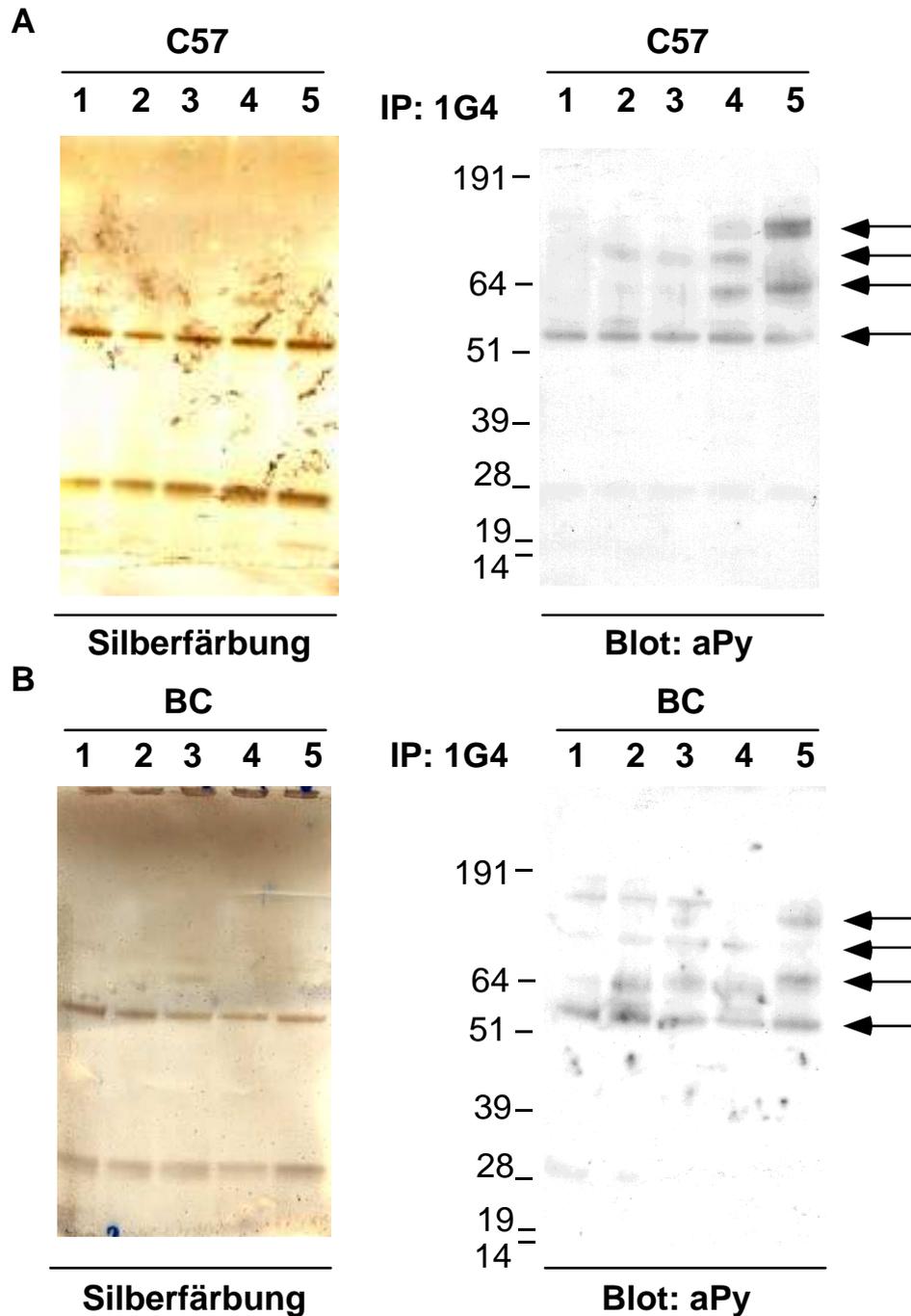


Abbildung 35: Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinasen in Maus Lymphknoten-Zellen (1G4-Präzipitate) B-Zell-depletierte Maus-Lymphknoten-Zellen wurden mit 100 μ M etheno-NAD markiert und anschließend für jeweils drei Minuten mit verschiedenen T-Zell-Stimulantien oder Pervanadat stimuliert. 1G4-Immünpräzipitate (100 μ l Hybridomüberstand, #72) wurden mit dem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper RC20 (RC20-POD, Verdünnung: 1 :2500) detektiert. Links ist jeweils die korrespondierende Silberfärbung gezeigt. A Der Versuch wurde mit C57BL/6-Mauslymphozyten durchgeführt: Spur 1: unstimulierte Zellen; Spur 2: Stimulation mit 10ng/ml PMA; Spur 3: Stimulation mit 10ng/ml PMA und 1 μ M Ionomycin; Spur 4: Stimulation mit

CD3 spezifischem polyklonales Immuneserum aus dem Kaninchen (10 µg/ml); Spur 5: Stimulation mit Natrium-Ortho-Vanadat **B** Der gleiche Versuch wurde mit Balb-C-Mauslymphknotenzellen durchgeführt.

In den mit Pervanadat stimulierten Zellen erschien zusätzlich eine Bande bei ca. 80 kDa, die in keiner anderen Spur sichtbar ist (Abb. 35B, Spur 5). Wie bei C57BL/6-Mäusen ist die Bande bei 70 kDa hier ebenfalls nicht vorhanden, die Bande von 64 kDa erscheint verstärkt. Da die Situation im Blot aus BALB/c T-Zellen nicht so deutlich ist, sind weitere Experimente nötig, um diese Frage zu klären.

In Immunpräzipitaten mit dem 4G10-Antikörper und anschließender Detektion mit dem 1G4-Antikörper zeigte sich in Abhängigkeit von Pervanadat-Stimulation und etheno-NAD-Markierung in LK-Zellen von C57BL/6 und Balb-C-Mäusen ein ähnliches Bandenmuster wie in den Versuchen an DC27.10-Zellen (Abb. 36, Spur 4 und 8). Es fanden sich neben der Bande bei 80 kDa, weitere Banden bei ca. 50 kDa und 83 kDa. Zusätzlich zeigte sich noch eine Bande bei 40 kDa (zumindest in den C57BL/6-Mäusen). Abb. 37 gibt eine schematische Übersicht über die in primären T-Zellen gefundenen Interaktionen. Die genaue Charakterisierung dieser interagierenden Proteine bleibt Aufgabe zukünftiger Experimente.

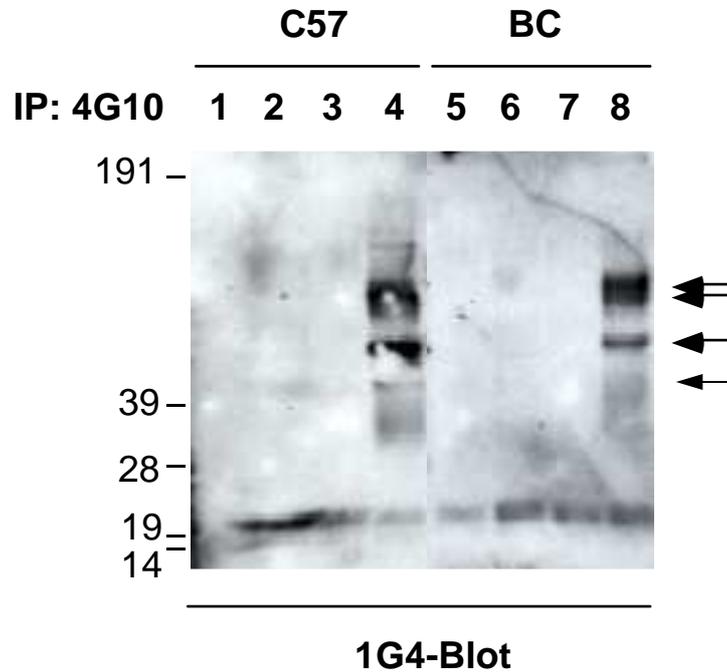


Abbildung 36: Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinasen in Maus Lymphknoten-Zellen (4G10-Präzipitate)

B-Zell-depletierte Maus-Lymphknoten- und Milz-Zellen wurden mit (Spuren 3, 4, 7, 8) oder ohne (Spuren 1, 2, 5, 6) 100µM etheno-NAD, 2mM ADPR, 1mM DTT markiert und anschließend für drei Minuten mit (Spuren 2, 4, 6, 8) oder ohne (Spuren 1, 3, 5, 7) Natrium-Ortho-Vanadat stimuliert. 4G10 Immunpräzipitate (10µl Matrix von an Sepharose gekoppeltem 4G10) wurden mit dem 1G4 Antikörper detektiert. Spur 1-4 zeigen C57BL/6-Zellen (6*10⁶/Spur), Spur 5-8 zeigen BalbC-Zellen (6*10⁶/Spur).

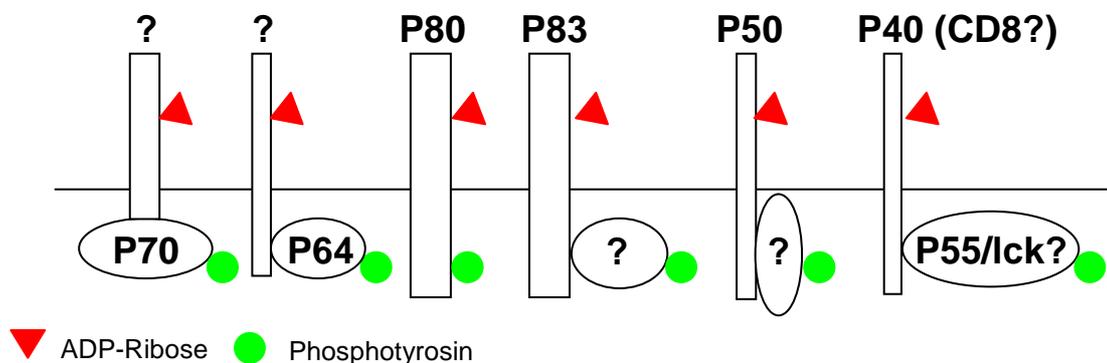


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinasen in Maus-LK-Zellen

p80 wird extra- und intrazelluläres von ARTs und Tyrosinkinasen modifiziert. Interaktion von p55 (möglicherweise Lck) mit p40 (möglicherweise CD8); Interaktionen von p70 und p64 mit

unbekannten ADP-ribosylierten Proteinen; Interaktion von p83 und p50 mit unbekanntem Tyrosin-phosphorylierten Proteinen.

4.3.4 Untersuchung des p80 mit einem PAG-spezifischen Antikörper

Als ein möglicher Kandidat für das p80 galt das „phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (GEMs)“: PAG. Dies erschien wahrscheinlich, da die ADP-Ribosyl-Transferasen ebenso wie PAG in Rafts lokalisiert sind (Bannas et al., 2005). Neben dieser räumlichen Nähe von Enzym und Substrat sprach des Weiteren noch die beschriebene Größe von PAG dafür, von dem beschrieben ist, dass es Tyrosin-phosphoryliert ca. 80 kDa groß ist (Brdicka et al., 2000). Ein Westernblot mit einem polyklonalen PAG-spezifischen Antiserum zeigte jedoch in mit etheno-NAD markierten 1G4-Immunpräzipitate von DC27.10^{mART2.1}-Transfektanten keine spezifischen Banden (Abb. 38B., Spuren 1-4). Nach Strippen der PVDF-Membran und erneuter Immundetektion mit dem RC-20-Antikörper zeigte sich, dass das ca. 80 kDa große Protein, welches nur in mit etheno-NAD und Pervanadat behandelten Zellen zu sehen ist (Abb. 38C, Spur 4) in einem Größenbereich liegt, das dem PAG in diesen Zellen nicht entspricht (Abb. 38B). Daraus ergibt sich, dass PAG nicht ADP-ribosylierbar ist und deshalb auch nicht das gesuchte p80 sein kann. Theoretisch lässt sich nicht ganz ausschließen, dass PAG zwar ADP-ribosyliert wird, aber nicht in der Immunpräzipitation vom 1G4-Antikörper erkannt wird. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich und müsste gegebenenfalls durch einen für die Immunpräzipitation geeigneten PAG spezifischen Antikörper erneut überprüft werden. In Immunpräzipitaten mit dem 4G10-Antikörper zeigte eine Bande bei ca 60 kDa, welche durch Pervanadat angereichert wurde (Abb. 38B, Spur 5-8). Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um PAG, was in den untersuchten Zellen eventuell nicht 80 kDa, sondern ca. 60 kDa groß ist. Dass PAG in verschiedenen Zellen unterschiedlich groß sein kann wurde von Brdicka et al. beschrieben (Brdicka et al., 2000). Ein weiteres Indiz dafür, dass PAG nicht das gesuchte p80 ist, ist also das kleinere Molekulargewicht von ca. 60 kDa in DC27.10-Zellen.

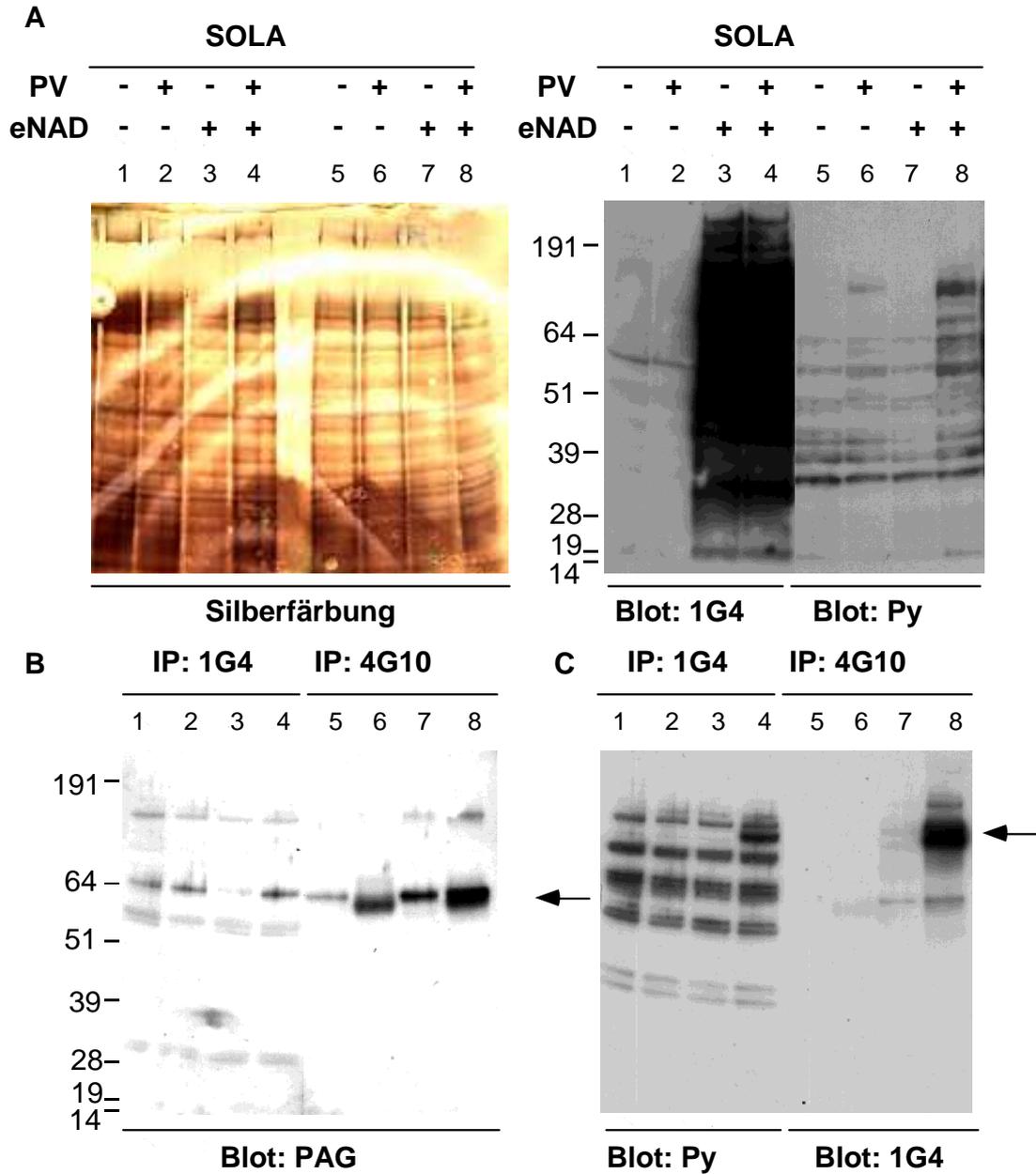


Abbildung 38: Untersuchung des p80 mit PAG spezifischem Antikörper im Westernblot
 DC27.10^{mART2.2}-Transfektanten wurden mit etheno-NAD inkubiert (jeweils Spur 3, 4, 7 und 8) und anschließend mit Pervanadat stimuliert (jeweils Spur 2, 4, 6 und 8). **A** Der Blot rechts zeigt ein Aliquot der Ganzzelllysate, die für die Präzipitationen in (B) und (C) verwendet wurden. Spur 1-4: Detektion mit 1G4, Spur 5-8: Detektion mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper RC-20. Links ist die korrespondierende Silberfärbung dargestellt. **B** Der Rest der Ganzzelllysate aus A wurde für Immunpräzipitationen verwendet. In Spur 1-4 wurde eine Immunpräzipitation mit dem 1G4-Antikörper, in Spur 5-8 eine Immunpräzipitation mit dem 4G10-Antikörper durchgeführt. Die Immundetektion des gesamten Blots erfolgte mit einem PAG spezifischen Antiserum. **C** Nach „Strippen“ der Membran aus b. (siehe Material und Methoden) wurde erneut detektiert: Spur 1-4: Detektion mit anti-Phosphotyrosin (RC-20); Spur 5-8: Detektion mit 1G4.

4.3.5 Interaktionen zwischen ART-Zielproteinen und der Tyrosinkinase

Lck

Etheno-NAD markierte DC27.10^{ART2.2}-Zellen wurden mit Lck spezifischem Antiserum immunpräzipitiert. Anschließend wurde eine Immundetektion mit dem 1G4-Antikörper durchgeführt. In Abhängigkeit von etheno-NAD ließen sich einige Banden im höheren molekularen Bereich copräzipitieren (Abb.39A). Dabei könnte es sich um ADP-ribosylierte Proteine handeln, die mit Lck interagieren.

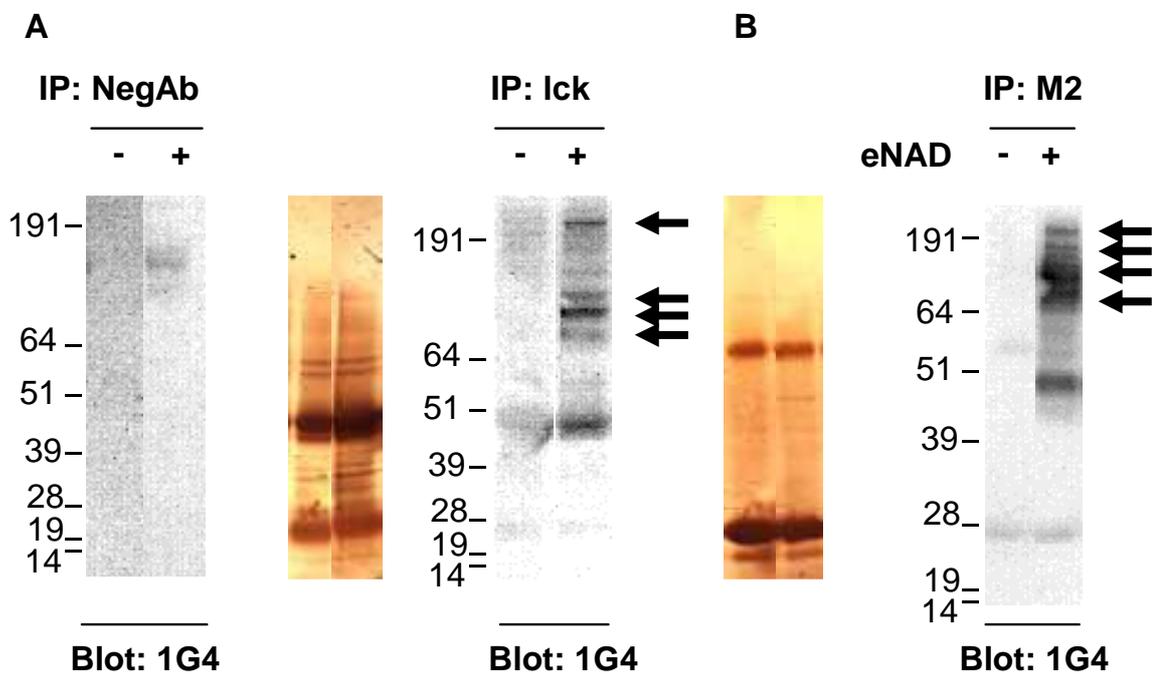


Abbildung 39: Interaktionen zwischen ART-Zielproteinen und Lck sowie ART-Zielproteinen und mART2.2

DC27.10^{mART2.2}-Transfektanten wurden mit oder ohne etheno-NAD (20 μ M) inkubiert und anschließend lysiert. Die Detektion erfolgte mit dem 1G4. **A** Der links gelegene Blot zeigt eine Immunpräzipitation mit einem unspezifischen Antikörper. In der Mitte ist die korrespondierende Silberfärbung zum Blot rechts dargestellt. Im rechten Blot ist eine Immunpräzipitation mit an Sepharose gekoppeltem Lck spezifischem Immunsereum dargestellt. Die Detektion erfolgte mit dem 1G4-Antikörper. **B** Es wurde eine Immunpräzipitation an DC27.10^{hART1}-Transfektanten mit M2-gekoppelter Sepharose durchgeführt. Links ist die korrespondierende Silberfärbung gezeigt.

4.3.6 Interaktionen zwischen ART-Zielproteinen und mART2.2

Etheno-NAD markierte DC27.10^{hART1}-Zellen wurden mit dem gegen den Flag-Tag gerichteten Antikörper M2 immunpräzipitiert, anschließend wurde eine Immundetektion mit dem 1G4-Antikörper durchgeführt. In Abhängigkeit von etheno-NAD ließen sich im höher molekularen Bereich einige Banden copräzipitieren (Abb. 39B). Dabei könnte es sich um ADP-ribosylierte Proteine handeln, die mit den ARTs interagieren.

Vergleicht man die Lck-Präzipitate mit den M2-Präzipitaten, fällt das ähnliche Bandenmuster der copräzipitierten ADP-ribosylierten Zielproteine auf. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass sowohl Lck als auch die ARTs in einem gemeinsamen Proteinkomplex vorliegen.

5 Diskussion

Um die Wirkungsweise eukaryotischer ARTs aufzuklären, ist die Identifizierung der daran beteiligten Zielproteine essentiell. So konnte in den letzten Jahren das durch ART vermittelte Auslösen von Apoptose in T-Zellen auf die ADP-Ribosylierung des Purinorezeptor P2X7 zurückgeführt werden (Seman et al., 2003). Alle beobachteten Effekte eukaryotischer ARTs lassen sich jedoch nicht durch diesen Mechanismus erklären. Im Mausstamm C57BL/6 fand sich eine natürliche Mutation (P451L), die die Sensitivität für NICD drastisch reduzierte (Adriouch et al., 2002). In diesem Mausstamm wurde jedoch eine Suppression von T-Zellfunktionen wie Proliferation, Zytotoxizität und Homing-Verhalten beobachtet ((Wang et al., 1994) (Okamoto et al., 1998)), so dass höchstwahrscheinlich weitere Zielproteine an diesen Effekten beteiligt sind. Die Identifizierung neuer Zielproteine der ARTs stand daher im Mittelpunkt dieser Arbeit.

5.1 Beurteilung des etheno-NAD-1G4-Assays

Vor der Identifizierung von ART-Zielproteinen stand das Problem der schwierigen Detektion von ADP-Ribosylierung. Der Nachweis ADP-ribosylierter Proteine wird bisher durch das Fehlen von monoklonalen Antikörpern gegen ADP-ribosylierte Aminosäuren erschwert. Im Jahre 1988 wurde von Young et al. an der Columbia Universität im Rahmen von Forschungen über die Kanzerogenität von Vinylchlorid ein monoklonaler Antikörper (1G4) entwickelt, der für ein mit einer etheno-Gruppe modifiziertes Adenosin spezifisch ist (Young and Santella, 1988). Es war bekannt, dass etheno-NAD von bakteriellen ARTs ((Hingorani and Ho, 1988) (Klebl and Pette, 1996)) und den im Zellkern lokalisierten Poly-ADP-Ribosyltransferasen (PARPs) (Davis et al., 1998) als Substrat erkannt wird. In dieser Arbeit wurde der 1G4-Antikörper genutzt, um ADP-Ribosylierung eukaryotischer ARTs zu untersuchen. Tatsächlich konnte im Zellkulturmodell und an primären Mauszellen bestätigt werden, dass die von ARTs auf Arginin-Reste von Zielproteinen übertragene etheno-Adenin-Dinukleotid-Ribose (etheno-ADPR) spezifisch vom

1G4-Antikörper erkannt wird. Dieser etheno-NAD-1G4-Assay wurde im FACS, im Westernblot und in der Immunpräzipitation eingesetzt.

Der 1G4-FACS-Assay

In Zellkulturzellen zeigte sich eine klare Abhängigkeit der 1G4-Anfärbbarkeit im FACS vom Substrat etheno-NAD und von der ART-Expression auf der Zelloberfläche (Abb. 13). Nach Inkubation mit etheno-ADP-Ribose zeigte sich hingegen kein Einbau in Zielproteine (Daten nicht gezeigt). Die Durchführung des 1G4-FACS-Assays erwies sich als äußerst schnell und unkompliziert. So konnten verschiedenste etablierte Zelllinien einfach auf ART-Aktivität hin gescreent werden. Von 44 gescreenten Zelllinien zeigten drei ART-Aktivität: Yac-1, MD27, SRD-10 (Krebs et al., 2003). Ferner konnte die Michaeliskonstante von mART2.2 bestimmt werden. Halb maximale Zell-Oberflächen-etheno-ADP-Ribosylierung ART2.2 transfizierter DC27.10-Zellen zeigte sich bei 1 μ M etheno-NAD (Krebs et al., 2003). Frühere Arbeiten, in denen lösliche, aufgereinigte ARTs, etheno-NAD und Agmatin als Akzeptor verwendet worden waren, hatten eine wesentlich höhere K_m gezeigt (im Bereich 300 μ M: (Armstrong and Merrill, 2001; Klebl and Pette, 1996)), so dass es den Anschein hat, als ob für ADP-Ribosylierung auf der Zelloberfläche deutlich geringere Mengen an etheno-NAD benötigt werden.

Durch Mehrfachfluoreszenzanalysen konnte die ADP-Ribosylierung auf Untergruppen von Zellpopulationen selektiv betrachtet werden (Krebs et al., 2003). Darüber hinaus wurde durch diesen Assay die Sortierung von Zellen anhand ihrer ART-Aktivität ermöglicht (Krebs et al., 2003).

Eine Beobachtung dieser Arbeit war, dass sich die Darstellung in der Durchflußzytometrie als sehr sensitiv erwies. Es war beispielsweise möglich, ADP-Ribosylierung in Jurkat-Zellen trotz hoher Expression von CD38 im FACS darzustellen (Abb. 23), wohingegen der Nachweis der ADP-Ribosylierung in der Autoradiographie nicht gelang (Daten nicht gezeigt).

Der 1G4-Westernblot-Assay

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das etheno-NAD-1G4-Westernblotverfahren mit der Autoradiographie vergleichbare Ergebnisse lieferte (Abb. 14-17), was dafür spricht, dass etheno-ADP-Ribose in die gleichen

Zielproteine wie ADP-Ribose eingebaut wird. Bekannte durch Autoradiographie identifizierte Zielproteine wie CD45, CD44 und LFA-1 ((Nemoto et al., 1996),(Liu et al., 1999; Okamoto et al., 1998)) ließen sich sehr gut im 1G4-Westernblot darstellen (Abb. 24). Für LFA-1 wurde im direkten Vergleich von Autoradiographie und 1G4-Westernblot ein ähnliches Bandenmuster nachgewiesen (Krebs et al., 2003). Auch humanes CD8alpha konnte sowohl mit ^{32}P -NAD als auch mit etheno-NAD markiert werden (Abb.27). Bei der etheno-ADP-Ribosylierung handelt es sich um eine SDS-resistente und somit kovalente Proteinmodifikation, die mit dem 1G4-Antikörper detektiert werden kann. Methodisch lässt sich feststellen, dass die Zielproteinbanden in den 1G4-Immunoblots wesentlich schärfer und besser abgrenzbar erschienen als bei den Banden der Autoradiographie. Ein weiterer Vorteil dieses Assays ist die Erleichterung, nicht radioaktiv arbeiten zu müssen. Die Etablierung des 1G4-Westernblotverfahrens verspricht beste Voraussetzungen zur weiteren Untersuchung ADP-ribosylierter Zielproteine und ihrer Interaktionspartner.

1G4-Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation etheno-ADP-ribosylierter Zielproteine ermöglichte es, Proteininteraktionen mit ART-Zielproteinen zu untersuchen. So konnten Interaktionen mit Tyrosin-phosphorylierten Zielproteinen nachgewiesen werden (Abb. 32-38).

Durch Nano-Elektro-Spray-Massenspektroskopie-Analysen von 1G4-Immunopräzipitaten gelang der Nachweis bekannter Zielproteine wie das β -2-Integrin (Bestandteil des LFA-1), sowie der Nachweis neuer, unbekannter Zielproteine wie DEC-205 und Neuropilin-1 (Abb. 29-31). Neben der Möglichkeit, diese neuen Zielproteine und ihren Einfluss auf die von der ADP-Ribosylierung abhängigen Effekte auf T-Zellen zu untersuchen, ergeben sich durch die Methode an sich neue, weiterführende Möglichkeiten. So erscheint es aussichtsreich, Zielproteine von primären Maus-T-Zellen massenspektroskopisch zu untersuchen. Darüber hinaus wären ähnliche Untersuchungen auch außerhalb des Immunsystems wie beispielsweise im Muskel oder Hoden denkbar.

Weitere Anwendungen des 1G4-Antikörper-Assays könnten mikroskopische Verfahren darstellen, in denen die ADP-Ribosylierung im Rahmen der

Immunologischen Synapse untersucht würde. Ein kürzlich entwickeltes *in situ* Mikroskopieverfahren, bei dem durch Zyklen von Antikörperfärbung und Bleichung viele Proteine auf derselben Zelle innerhalb von Geweben dargestellt werden können (Schubert et al., 2006), könnte in Kombination mit dem 1G4-Assay eingesetzt werden, um ART-Aktivität auf Geweben zu analysieren. So könnten lymphatische Organe nach i.v. Applikation von etheno-NAD auf etheno-ADP-ribosylierte T-Zellen hin untersucht werden. Auch die Rolle von CD38 induzierter Inhibierung *in trans* könnte so *in vivo* untersucht werden.

5.2 Überlegungen zur Zielproteinspezifität eukaryotischer ART

Neben den schon seit längerem bekannten Zielproteinen auf der Oberfläche von primären Maus T-Lymphozyten wie LFA-1 (α L/ β 2-Integrin): (Nemoto et al., 1996), CD8, CD45, CD44, CD43 und CD27 ((Liu et al., 1999; Okamoto et al., 1998)) wurde bei CD4, CD2 (LFA-2), CD28, CD48, α ₄-Integrins, L-selectin, (Okamoto et al., 1998), CD29, CD40L, CD54 und CD62L (Liu et al., 1999) nachgewiesen, dass sie keine Zielproteine der ARTs sind. Zum Zeitpunkt dieser Veröffentlichungen war jedoch nicht bekannt, wie viele ARTs und welche Art von ART für die Modifizierung dieser Zielproteine verantwortlich waren. Anhand der Doppel-Knock-Out-Mäuse für ART2.1 und ART2.2 konnte diese Frage beantwortet werden (Ohlrogge et al., 2002). Auf diesen Doppel-Knock-Out-Mäusen zeigte sich nämlich keine ART-Aktivität mehr, so dass die für die ADP-Ribosylierung von Zielproteinen auf Maus-T-Zellen verantwortliche ART eindeutig ART2 und nicht, wie von Okamoto et al. 1998 noch angenommen, ART1 ist. Trotzdem ließen sich auch in ART1 transfizierten EL4-Lymphomazellen dieselben Zielproteine wie auf primären Lymphozyten nachweisen (Liu et al., 1999), so dass mART2.2 und mART1 nicht spezifisch für die untersuchten Zielproteine zu sein scheinen. Im Gegensatz zu bakteriellen ARTs, die häufig nur für ein bestimmtes Protein spezifisch sind ((Aktories et al., 1986; Gierschik, 1992)), zeigen murine eukaryotische ARTs anscheinend die ADP-Ribosylierung einer Vielzahl von Proteinen und verhalten sich somit möglicherweise eher wie z.B. intrazelluläre Phosphotyrosinkinasen (Lck, ZAP-

70), die verschiedene Zielproteine modifizieren können ((Veillette et al., 1988) (Montixi et al., 1998)).

In dieser Arbeit wurde die Zielproteinspezifität von mART1, hART1, mART2.1 und mART2.2 vergleichend in Zellkulturzellen untersucht. Dabei zeigten sich in Ganzzelllysaten von verschiedenen ART-Transfektanten ähnliche Bandenmuster und keine signifikanten Unterschiede (Abb. 13-17). Es erscheint somit möglich, dass die verschiedenen Transferasen keine eindeutige Zielproteinspezifität zeigen. Für zwei der bekannten Zielproteine, CD44 und LFA-1, wurde der direkte Vergleich zwischen den verschiedenen Transferasen selektiv untersucht. Dabei zeigte sich in allen untersuchten DC27.10-Transfektanten eine Markierung beider Ketten von LFA-1. Die Intensität der Markierung war jedoch unterschiedlich. So kam es beim hART1 zu einer stärkeren Markierung der α -Kette im Verhältnis zur β -Kette, beim mART2.1 hingegen zu einer stärkeren Markierung der β -Kette im Verhältnis zur α -Kette. Somit zeigten sich die verschiedenen Transferasen zwar in der Lage, die beiden LFA-1-Ketten zu modifizieren, die Effizienz der Markierung der beiden LFA-1-Ketten unterscheidet sich jedoch für mART2.1 und hART1 deutlich. Möglicherweise ist die insgesamt geringere Intensität des durch hART1 modifizierten LFA-1 durch die für hART1 anders konformierten Maus-Zielproteine zu erklären. CD44 und das unbekanntes p80 zeigten sich ebenfalls als Zielproteine aller untersuchter Transferasen (mART1, mART2.2, mART2.1 und hART1; Abb. 26 und 34). Interessanterweise zeigte sich beim p80 jedoch keine verminderte Intensität bei Modifikation durch hART1 im Gegensatz zu mART1 (Abb. 34).

Die Transferasen mART2.1, mART2.2, mART1 zeigten bei der Untersuchung auf Auto-ADP-Ribosylierung jeweils eine prominente Bande (Abb. 28). Beim hART1 (im Gegensatz zum mART1) zeigten sich jedoch zwei Banden bei ca. 40 und 45 kDa (dagegen beim mART1 nur eine Bande bei ca. 45 kDa). Dies ist höchstwahrscheinlich durch unterschiedliche Glykosylierungen von hART1 zu erklären. Ob die Auto-ADP-Ribosylierung in vivo relevant ist, möglicherweise z.B. die eigene Enzymfunktion verändert, ist bisher ungeklärt.

5.3 Überlegungen zur ADP-Ribosylierung im Rahmen der immunologischen Synapse

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, konnte die ADP-Ribosylierung löslicher Zielproteine in *trans*-Stellung durch rekombinante ARTs und zytoplasmatische ARTs bereits an einer Reihe von Zielproteinen nachgewiesen werden. Solche Zielproteine könnten z.B. Zytokine sein, die im Bereich lokaler inflammatorischer Prozesse sezerniert wurden, da hier NAD-Konzentrationen vorkommen, die eine ADP-Ribosylierung ermöglichen (Adriouch et al., 2007).

Ob membranverankerte ARTs Zielproteine auf Nachbarzellen *in vivo in trans* ADP-ribosylieren können, ist eine spannende, bisher nicht beantwortete Frage. Durch den 1G4-FACS-Assay existiert ein Verfahren, mit dem sich diese Frage sehr gut untersuchen ließe. Erste Versuche dazu in dieser Arbeit konnten eine ADP-Ribosylierung in *trans*-Stellung auf in enge Nachbarschaft gebrachten Lymphomzellen unter den gewählten Bedingungen nicht nachweisen. Weitere *in vitro* Versuche unter Verwendung künstlicher Adhäsionsbedingungen, z.B. durch vernetzende Antikörper, wären jedoch nötig, um physiologische Zellkontakte besser zu imitieren. Es erscheint außerdem sehr aussichtsreich, die ADP-Ribosylierung von Zielproteinen in *trans*-Stellung während der „priming“-Phase von T-Zelle und dendritischer Zellen während der Ausbildung der immunologischen Synapse zu untersuchen.

5.4 Überlegungen zu den neu identifizierten Zielproteinen Neuropilin-1 und DEC-205

Neuropilin-1 und DEC-205 sind in der Maus sowohl auf dendritischen Zellen als auch auf T-Zellen exprimiert, wobei DEC-205 nur in sehr geringem Maße auf T-Zellen exprimiert wird (siehe Einleitung). Sie stellen also sowohl *in trans* als auch *in cis* mögliche ART-Zielproteine dar.

Es wäre interessant zu untersuchen, ob die ADP-Ribosylierung von DEC-205 Auswirkungen auf die Antigenaufnahme und die Antigenpräsentation dendritischer Zellen hat. In welchem physiologischen Kontext diese Modifikation möglicherweise eine Rolle spielen könnte, ist momentan jedoch völlig offen. Da die Funktion von

DEC-205 auf T-Zellen ebenfalls bisher nicht aufgeklärt ist, ist es schwierig, Vorhersagen über eine Beeinflussung durch ADP-Ribosylierung anzustellen. DEC-205 zeigte in präklinischen Vakzinierungsstudien erfolgversprechende Ergebnisse im Melanom-Tumormodell (Mahnke et al., 2005). Dabei wurden Tumorassoziierte Antigene mit einem für DEC-205 spezifischen Antikörper fusioniert, und die eingebrachten Antigene konnten so *in vivo* spezifisch in dendritische Zellen an den MHC-II-Komplex appliziert werden (Trumpfheller et al., 2006). Sollte es durch ADP-Ribosylierung zu einer Inhibierung von DEC-205 kommen, wäre ein Fusionsprotein einer ART mit einem DEC-205 spezifischen Antikörper möglicherweise ebenfalls ein interessantes „Werkzeug“, um DEC-205 spezifische Immunreaktionen auf dendritischen Zellen abzuschalten.

Neuropilin-1 ist sowohl auf dendritischen Zellen als auch auf T-Zellen exprimiert und an der frühen Phase der Ausbildung der immunologischen Synapse beteiligt (Tordjman et al., 2002). Dabei könnte ADP-Ribosylierung möglicherweise, ähnlich wie für LFA-1 beschrieben (Nemoto et al., 1996), zu einer Inhibierung der homotypischen Adhäsion führen. Bourbie-Vaudaine et al. zeigten kürzlich, dass Neuropilin-1 in einem als „trogocytosis“ bezeichneten Austausch von dendritischer Zelle und CD4 positiver T-Zelle beteiligt ist (Bourbie-Vaudaine et al., 2006). Ferner kam es nach „trogocytosis“ von Neuropilin-1 von dendritischer Zelle zur T-Zelle zu einer Rekrutierung von "vascular endothelial growth factor" (VEGF) (Bourbie-Vaudaine et al., 2006). Es wäre interessant zu untersuchen, ob ADP-Ribosylierung diesen Prozess beeinflussen würde, und ob VEGF möglicherweise Zielprotein von ARTs ist. In verschiedenen soliden Tumoren, sowie in akuter myeloischer Leukämie konnte eine vermehrte Expression von Neuropilin-1 nachgewiesen werden ((Baba et al., 2007) (Hu et al., 2007)). Dabei bindet Neuropilin-1 nur an die Isoform des VEGF (VEGF₁₆₅: (Mac Gabhann and Popel, 2005)), die für die pathologische Tumorangio-genese verantwortlich ist. Sollte es durch ADP-Ribosylierung zu einer Inhibierung von Neuropilin-1 kommen, wäre dies ein möglicher Ansatz einer immunbasierten Antitumortherapie.

Neuropilin-1 wurde ferner als Oberflächenmarker für regulatorische T-Zellen identifiziert (Bruder et al., 2004), was die interessante Rolle von Neuropilin-1 auf CD4 positiven T-Zellen unterstreicht.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Neuropilin-1 und DEC-205 sehr vielversprechende ART-Zielproteine sind, deren Funktion in künftigen Experimenten weiter aufgeklärt werden müßte.

5.5 Beurteilung der Ergebnisse an chimären Varianten aus mART2.2 und rtART2.2

Die Enzymeigenschaften von mART2.2 und rtART2.2 unterscheiden sich deutlich. Rekombinant hergestelltes rtART2.2 (RT6.2) zeigte im Gegensatz zu rtART2.1 (RT6.1) eine Auto-ADP-Ribosyltransferaseaktivität (Karsten et al., 1997). Eine ADP-Ribosylierung von Fremdproteinen konnte durch rtART2.2 jedoch nicht nachgewiesen werden (Karsten et al., 1997). mART2.2 besitzt die Fähigkeit, sich selbst und andere Zielproteine zu ADP-ribosylieren, es besitzt jedoch nur geringe NADase-Aktivität. Diese an rekombinanten ARTs beobachteten Effekte konnten in dieser Arbeit im Zellkulturmodell durch Untersuchungen an chimären Maus-ART2.2-RT6.2-Transfektanten bestätigt werden (Abb. 20 und 21). Mit Hilfe des 1G4-Immunoblot-Assay ließ sich dabei die Auto-ADP-Ribosylierung sehr gut von der ADP-Ribosylierung anderer Zelloberflächenproteine abgrenzen.

5.6 Beurteilung des Zusammenspiels zwischen CD38 und ARTs

CD38 ist ein NAD verstoffwechselndes Ektoenzym, welches ubiquitär auf hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Es stellte sich die Frage nach der Wechselwirkung von CD38 und ARTs im Immunsystem. Krebs et al. konnten 2005 zeigen, dass die ADP-Ribosylierung auf T-Zellen durch das gleichzeitige Vorhandensein CD38 positiver B-Zellen reduziert wurde (Krebs et al., 2005). Des Weiteren fand sich in CD38^{-/-} T-Zellen eine stärkere ADP-Ribosylierung als in Wild-Typ-T-Zellen (Krebs et al., 2005). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transfektion von ARTs in Zellen mit nur geringer CD38 Expression zu einer wesentlich höheren Zelloberflächen-ADP-Ribosylierung führte

als die Transfektion in Zellen mit hoher CD38 Expression (Abb. 23). Dabei ist bemerkenswert, dass CD38 trotz geringer Zellkonzentrationen (5×10^6 Zellen/ml), das zugeführte etheno-NAD auch in Bereichen um $100 \mu\text{M}$ so stark abzubauen, dass die ART-Aktivität deutlich reduziert wird (Abb. 23). CD38 scheint die Stärke der ADP-Ribosylierung auf T-Lymphozyten somit in *cis*- und in *trans*-Stellung zu beeinflussen. Sowohl der *trans*- als auch der *cis*-Effekt lassen sich durch Reduktion des für die ARTs verfügbaren Substrats NAD durch CD38 erklären. *In vivo* scheint der *trans*-Effekt jedoch die entscheidendere Rolle zu spielen, da nur eine geringe Population von T-Zellen CD38 coexprimiert. ARTs könnten somit als „NAD-Sensoren“ betrachtet werden, die die extrazelluläre NAD-Konzentration in ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen umsetzen, wohingegen CD38 die ADP-Ribosylierung durch Verminderung des Substrats NAD zeitlich terminiert.

Es ergibt sich die Frage nach den *in vivo* vorkommenden intra- und extrazellulären NAD-Konzentrationen. NAD kommt intrazellulär als Coenzym in millimolaren Konzentrationen vor, wohingegen die extrazelluläre Konzentration im Serum im submikromolaren Bereich liegt ((Jacobson and Jacobson, 1997)). Es gibt verschiedene Hypothesen, wie das intrazellulär entstehende NAD in den Extrazellulärraum gelangen könnte, um dort als Signalmolekül aktiv zu werden. Möglicherweise werden Nukleotide nach zellulärem Stress, z.B. durch Scherkräfte oder andere Arten der Stimulation von körpereigenen Zellen freigesetzt ((Ziegler, 2000) (la Sala et al., 2003) (Lazarowski et al., 2003)). Ein Mechanismus zur nicht lytischen Freisetzung von NAD wurde auf Connexin 43 exprimierenden Zellen beschrieben (Bruzzone et al., 2001). Des Weiteren erscheint es plausibel, dass zu Grunde gegangene Bakterien oder Wirtszellen während akuter Infektionen potentielle NAD-Quellen darstellen, wobei *Staphylococcus aureus* beispielsweise auch NAD in die Umgebung sezerniert (Niven and Le Blanc, 1992). Kürzlich konnte in einem Mausmodell für eine akute Inflammation nachgewiesen werden, dass diese NAD-Konzentrationen ausreichend waren, um ART-Aktivität auszulösen (Adriouch et al., 2007). Darüber hinaus könnten sich erhöhte NAD-Konzentrationen im extrazellulären Kompartiment auch im Rahmen physiologischer Nekrosen wie bei der Abstoßung der Uterusschleimhaut oder nach Traumata finden.

Han et al. konnten 2000 CD38 als Zielprotein der ARTs nachweisen (Han et al., 2000). Im Rahmen meiner Arbeit gelang jedoch der Nachweis von CD38 als Zielprotein der ARTs nicht. Die in der Arbeit von Han et al. gemachte Beobachtung, dass die Inkubation von B-Zellen aus Balb/c-Mäusen mit löslichen, aufgereinigten ARTs und NAD zur Apoptose dieser B-Zellen führt (Han et al., 2000), verleitet zu der Annahme, dass lösliche ARTs möglicherweise auch in T-Zellen P2X7-vermittelte Apoptose in *trans*-Stellung auslösen könnten. Hierzu könnten einfach durchführbare Versuche unter Zuhilfenahme des 1G4-FACS-Assay Aufschluss geben.

Kürzlich konnte von Chen et al. im NOD/Lt-Maus-Modell gezeigt werden, dass ART2.2 in die Pathogenese des Diabetes involviert ist (Chen et al., 2006). Dabei zeigten sich in congenen NOD-Mäusen, in die das CD38^{-/-}-Allel eingebracht wurde, eine beschleunigte Entwicklung des Diabetes. In Mäusen mit eingebrachtem ART2.2^{-/-}-Allel fand sich hingegen keine Abweichung zum Wildtyp-NOD-Stamm. Wurden jedoch congenen CD38^{-/-}- und ART2.2^{-/-}-Mäuse untersucht, zeigten ca. 70% kein Auftreten des Diabetes mehr (Chen et al., 2006). Zur Aufklärung der in die Diabetesentwicklung involvierten Signalwege erscheint die genaue Analyse der involvierten ART-Zielproteine entscheidend und vielversprechend.

5.7 Überlegungen zur Signaltransduktionskaskade der ADP-Ribosylierungsreaktion

Um etwas über die Funktion von ARTs herauszufinden, hat die Identifizierung der daran beteiligten Zielproteine höchste Priorität. Um die Inhibierung der Funktion von T-Lymphozyten durch NAD zu erklären, wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt. Die erste Arbeitshypothese war dabei, dass die ADP-Ribosylierung von Zielproteinen auf T-Zellen die Signaltransduktion der T-Zell-Aktivierung beeinflusst. Es lag nahe, den T-Zell-Rezeptorkomplex selbst als Zielprotein der ARTs zu vermuten. Es zeigte sich jedoch, dass CD3 ϵ , CD3- ζ (Okamoto et al., 1998), TCR α , TCR β , CD3- γ und CD3- δ (Liu et al., 1999) keine Zielproteine der ARTs darstellten und somit das direkte „erste Signal“ nicht involviert erschien. Es wurde ferner vermutet, dass die Signaltransduktion via CD8 durch dessen ADP-Ribosylierung inhibiert wird und sich dies in reduzierter Autophosphorylierung der mit CD8 assoziierten Src-Kinase Lck darstellt ((Liu et al., 1999; Wang et al., 1996)). Ob den darüber hinaus identifizierten Zielproteinen wie CD27, CD43, CD44, CD45 in Abhängigkeit von ADP-Ribosylierung eine wichtige Funktion zukommt, wurde bisher nicht gezeigt. Wahrscheinlicher erschien somit, dass ein anderer Signalweg an der Vermittlung der Inhibierung der Funktion von T-Lymphozyten beteiligt war. Grundsätzlich müsste ein ADP-ribosyliertes Zielprotein entweder selbst das Signal ins Innere der Zelle fortleiten oder auf andere benachbarte Proteine aktivierend oder hemmend einwirken. Beim P2X7-Rezeptor erscheinen beide dieser Möglichkeiten denkbar. Entweder führt die ADP-Ribosylierung von P2X7 direkt zur seiner Aktivierung oder ADP-ribosylierte unbekannte andere Zielproteine aktivieren den P2X7-Rezeptor. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, durch ADP-Ribosylierung die Bindungsstelle für einen Rezeptor zu blockieren wie im Fall des LFA-1 (Nemoto et al., 1996)), was auch im Rahmen autokriner Stimulation der Zellen direkte Auswirkungen auf die eigene Zellaktivierung haben könnte. Weitere theoretisch denkbare Mechanismen der Signaltransduktion wären, dass die ADP-Ribosylierung zu einer Konformationsänderung eines Rezeptors führt, mit direkten intrazellulär Auswirkungen (wie z.B. intrazellulärer Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors), oder dass es zu einer Änderung der physikalischen Bindungseigenschaften zu

anderen Proteinen kommt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Zerfall eines Rezeptors in einzelne Bestandteile mit aktivierender oder inhibierender Aktivität gehemmt wird. Möglicherweise könnte auch die extrazelluläre Zusammenlagerung der an der immunologischen Synapse beteiligten Proteine auf T-Zellen direkt durch ADP-Ribosylierung beeinflusst werden.

Adriouch et. al. beobachteten 2001 die NAD induzierte Apoptose und stellten damit die Hypothese auf, nicht die Interferierung in die physiologische T-Zell-Aktivierung, sondern ein eigenständiger Signalweg sei für die durch NAD vermittelten Effekte verantwortlich (Adriouch et al., 2001). 2003 konnte durch Seman et al. gezeigt werden, dass die Auslösung von Apoptose abhängig vom Purinorezeptor P2X7 war (Seman et al., 2003). Der genaue Mechanismus, der zur Aktivierung von P2X7 führte, ist jedoch bisher nicht aufgeklärt, so dass die Identifizierung weiterer möglicherweise daran beteiligter Zielproteine von entscheidender Bedeutung ist.

5.8 Beurteilung der Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinase

In murinen Lymphknotenzellen zeigten sich zahlreiche Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinase. Dabei fand sich ein ca. 80 kDa großes Protein, was Tyrosin-phosphoryliert und ADP-ribosyliert wurde, drei Tyrosin-phosphorylierte Proteine (p70, p64 und p55), die mit ART-Zielproteinen interagierten, sowie drei ADP-ribosylierte Zielproteine (p83, p50 und p40), die mit Tyrosin-phosphorylierten Proteinen interagierten (Abb. 35 und 36).

Möglicher Kandidat für das p55 wäre die Src-Kinase Lck, die mit dem p40 interagieren könnte, da eine solche Interaktion zwischen einem unbekanntem ADP-ribosylierten p40 Protein und Lck bereits von Wang et al. 1996 beschrieben wurde (Wang et al., 1996). In CTLs aus C57BL/6-Mäusen hemmte die ADP-Ribosylierung die durch anti-CD8-Antikörper vermittelte Autophosphorylierung von Lck (Liu et al., 1999; Wang et al., 1996). Bei dem p40 könnte es sich somit möglicherweise um CD8 handeln.

Die Interaktion zwischen dem p70 und ART-Zielproteinen zeigte sich nur nach PMA/Ionomycin- und nach CD3-Stimulation, nicht jedoch nach

Pervanadatbehandlung. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre z.B., dass durch die T-Zell-Aktivierung einer unbekanntenen Tyrosinkinase induziert wird. Eine Regulation durch Inhibition einer Phosphatase erscheint unwahrscheinlich, da sich nach Behandlung mit dem Phosphatase-Inhibitor Pervanadat keine Bande zeigte.

Die Interaktionen zwischen p64 und das p80 und ART-Zielproteinen fand sich nur nach CD3- oder Pervanadatstimulation, nicht jedoch nach Stimulation mit PMA/Ionomycin. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass diese beiden Proteine im Rahmen der frühen Signaltransduktion phosphoryliert werden, da PMA/Ionomycin die frühe Signaltransduktion umgeht und intrazellulär ansetzt. Diese beiden Zielproteine erscheinen daher als hochinteressante Zielprotein der ARTs, welche möglicherweise an der frühen Signaltransduktion von T-Zellen beteiligt sind.

Das wohl interessanteste Zielprotein ist das p80, da es sich hierbei um einen Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität handeln könnte und solche Rezeptoren häufig an der Einleitung der Signaltransduktion beteiligt sind. Das p80 konnte im humanen Zellkulturmodell nachgewiesen werden (Abb. 34) und könnte somit möglicherweise an durch ADP-Ribosylierung vermittelten Zellfunktionen beteiligt sein. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem p80 nicht um das „phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains“ (PAG) handelt. PAG galt aufgrund seiner Assoziation mit den Rafts und seiner ähnlichen molekularer Größe von ca. 80 kDa als möglicher Kandidat für das p80.

Versuche im Rahmen dieser Arbeit, die unbekanntenen ADP-ribosylierten Zielproteine durch Massenspektroskopie von 1G4-Immunpräzipitaten zu identifizieren, scheiterten an der unzureichenden quantitativen Anreicherung. Es erscheint jedoch für zukünftige Versuche ein sehr aussichtsreiches und wichtiges Vorhaben, da es sich bei diesen Proteinen möglicherweise um Schnittstellen zwischen extrazellulärer ADP-Ribosylierung und intrazellulärer Tyrosin-phosphorylierung handeln könnte, wobei Tyrosinkinasen und ihre Zielproteine, wie in der Einleitung dargestellt, essentielle Akteure bei der T-Zellaktivierung sind.

6 Perspektiven

Durch die Etablierung des 1G4-Assays ist die Untersuchung von ADP-Ribosylierung wesentlich erleichtert worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der 1G4-Assay zur Detektion ADP-ribosylierter Proteine im Westernblot etabliert. Dieser Assay wurde mittlerweile auch schon von anderen Arbeitsgruppen verwendet ((Kawamura et al., 2005; Seman et al., 2003)) und wird die Arbeit zur ADP-Ribosylierung in Zukunft weiter erleichtern. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ferner der erfolgreiche Einsatz des 1G4-Antikörper in der Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Weitere massenspektroskopische Untersuchungen von 1G4-Immunpräzipitaten unter optimierten Bedingungen stellen für zukünftige Experimente eine interessante Herausforderung dar, um unbekannte Zielproteine zu identifizieren. Zu optimieren wäre die Methode z.B., indem versucht würde, mit etheno-Adenosin die Bindung der ADP-ribosylierten Zielproteine an den 1G4-Antikörper zu antagonisieren, da sich in solch einem Eluat kein kontaminierender Antikörper mehr befände. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte unbekannte ca. 80 k-Da große Protein, welches sich als extrazelluläres Zielprotein von ARTs und intrazelluläres Zielprotein von Tyrosinkinase zeigte, ist sicherlich das interessanteste und vielversprechendste unbekannte Zielprotein für diese Versuche, da es sich möglicherweise um ein Schlüsselprotein in der Signaltransduktion handeln könnte. Des Weiteren erscheint es interessant, die Interaktionspartner der ART-Zielproteine zu identifizieren und zu charakterisieren. Die in dieser Arbeit identifizierten Zielproteine DEC-205 und Neuropilin-1 könnten möglicherweise im Rahmen der immunologischen Synapse eine wichtige Rolle spielen. Der 1G4-Assay erscheint dabei als geeignetes Werkzeug, die Fragestellung der ADP-Ribosylierung in *trans*-Stellung innerhalb der immunologischen Synapse zu untersuchen. Weitere Versuche müssten zeigen, ob die Funktion von DEC-205 und Neuropilin durch ADP-Ribosylierung zu beeinflussen ist.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Darstellung ADP-ribosylierter Proteine etabliert. Dafür wurde ein für etheno-Adenosin spezifischer Antikörper (1G4), sowie etheno-NAD als Substrat der ARTs verwendet. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war dabei die Etablierung dieses 1G4-Assays im Western Blot. Dabei konnten bekannte Zielproteine wie Maus LFA-1, CD44, CD45 dargestellt werden, sowie der Nachweis von humanem CD8-alpha als Zielprotein erbracht werden. Ferner wurde die Zielproteinspezifität unterschiedlicher ARTs untersucht. Durchflußzytometrisch konnte mit dem 1G4-Assay eine CD38 vermittelte Hemmung der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen *in cis* gezeigt werden. ADP-Ribosylierung *in trans* konnte nicht nachgewiesen werden. Mittels massenspektroskopischer Analyse von 1G4-Immunpräzipitaten konnten DEC-205 und Neuropilin-1 als neue Zielproteine der ARTs identifiziert werden. Darüber hinaus wurden Interaktionen zwischen Zielproteinen von ARTs und Tyrosinkinasen nachgewiesen. Es fanden sich ein ca. 80 kDa großes Protein, was Tyrosin-phosphoryliert und ADP-ribosyliert wurde, drei Tyrosin-phosphorylierte Proteine (p70, p64 und p55), die mit ART-Zielproteinen interagierten, sowie drei ADP-ribosylierte Zielproteine (p83, p50 und p40), die mit Tyrosin-phosphorylierten Proteinen interagierten. Die Versuche zur T-Zell-Stimulation an primären Maus-T-Zellen erbrachten Hinweise darauf, dass zwei dieser Proteine (p80 und das p64) möglicherweise in die frühe Signaltransduktion von T-Zellen involviert sein könnten.

8 Literaturverzeichnis

- Ablamunits V, Bridgett M, Duffy T, Haag F, Nissen M, Koch-Nolte F, et al. Changing patterns of cell surface mono (ADP-ribosyl) transferase antigen ART2.2 on resting versus cytopathically-activated T cells in NOD/Lt mice. *Diabetologia* 2001; 44: 848-58.
- Adriouch S, Dox C, Welge V, Seman M, Koch-Nolte F, Haag F. Cutting edge: a natural P451L mutation in the cytoplasmic domain impairs the function of the mouse P2X7 receptor. *J Immunol* 2002; 169: 4108-12.
- Adriouch S, Hubert S, Pechberty S, Koch-Nolte F, Haag F, Seman M. NAD⁺ Released during Inflammation Participates in T Cell Homeostasis by Inducing ART2-Mediated Death of Naive T Cells In Vivo. *J Immunol* 2007; 179: 186-194.
- Adriouch S, Ohlrogge W, Haag F, Koch-Nolte F, Seman M. Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: requirement for mono(ADP-ribosyl)transferase 2 and a downstream effector. *J. Immunol.* 2001; 167: 196-203.
- Aktories K. ADP-ribosylating toxins. Vol 175. Berlin: Springer Verlag, 1991.
- Aktories K. Clostridial ADP-ribosylating toxins: effects on ATP and GTP-binding proteins. *Mol Cell Biochem* 1994; 138: 167-76.
- Aktories K, Barmann M, Ohishi I, Tsuyama S, Jakobs KH, Habermann E. Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature* 1986; 322: 390-2.
- Aktories K, Just I. Bacterial Protein Toxins. Berlin: Springer Verlag, 2000.
- Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998a; 188: 1359-68.
- Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998b; 392: 86-9.
- Allport JR, Donnelly LE, Kefalas P, Lo G, Nunn A, Yadollahi-Farsani M, et al. A possible role for mono (ADP-ribosyl) transferase in the signalling pathway mediating neutrophil chemotaxis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1996; 42: 99-106.
- Anderson HA, Hiltbold EM, Roche PA. Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat Immunol* 2000; 1: 156-62.
- Armstrong S, Merrill AR. Application of a fluorometric assay for characterization of the catalytic competency of a domain III fragment of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Anal. Biochem.* 2001; 292: 26-33.
- Aswad F, Kawamura H, Dennert G. High sensitivity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. *J Immunol* 2005; 175: 3075-83.
- Baba T, Kariya M, Higuchi T, Mandai M, Matsumura N, Kondoh E, et al. Neuropilin-1 promotes unlimited growth of ovarian cancer by evading contact inhibition. *Gynecol Oncol* 2007; 105: 703-11.

- Balducci E, Horiba K, Usuki J, Park M, Ferrans VJ, Moss J. Selective expression of RT6 superfamily in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21: 337-46.
- Bannas P, Adriouch S, Kahl S, Braasch F, Haag F, Koch-Nolte F. Activity and specificity of toxin-related mouse T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 depends on its association with lipid rafts. *Blood* 2005; 105: 3663-70.
- Batista FD, Iber D, Neuberger MS. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 2001; 411: 489-94.
- Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 2004; 199: 815-24.
- Boulle N, Jones EM, Auguste P, Baird A. Adenosine diphosphate ribosylation of fibroblast growth factor-2. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 767-75.
- Bourbie-Vaudaine S, Blanchard N, Hivroz C, Romeo PH. Dendritic cells can turn CD4+ T lymphocytes into vascular endothelial growth factor-carrying cells by intercellular neuropilin-1 transfer. *J Immunol* 2006; 177: 1460-9.
- Bozzacco L, Trumpfheller C, Siegal FP, Mehandru S, Markowitz M, Carrington M, et al. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 1289-94.
- Brdicka T, Pavlistova D, Leo A, Bruyns E, Korinek V, Angelisova P, et al. Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med* 2000; 191: 1591-604.
- Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14: 111-36.
- Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 623-30.
- Bruzzone S, Guida L, Zocchi E, Franco L, De Flora A. Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. *Faseb J*. 2001; 15: 10-12.
- Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 1999; 189: 821-9.
- Cervantes-Laurean D, Loflin PT, Minter DE, Jacobson EL, Jacobson MK. Protein modification by ADP-ribose via acid-labile linkages. *J Biol Chem* 1995; 270: 7929-36.
- Chen J, Chen YG, Reifsnyder PC, Schott WH, Lee CH, Osborne M, et al. Targeted disruption of CD38 accelerates autoimmune diabetes in NOD/Lt mice by enhancing autoimmunity in an ADP-ribosyltransferase 2-dependent fashion. *J Immunol* 2006; 176: 4590-9.
- Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2001; 36: 849-65.
- Cockayne DA, Muchamuel T, Grimaldi JC, Muller-Steffner H, Randall TD, Lund FE, et al. Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide

- glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood* 1998; 92: 1324-33.
- Contreras JE, Sanchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, et al. Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2002; 99: 495-500.
- Davis DM, Chiu I, Fassett M, Cohen GB, Mandelboim O, Strominger JL. The human natural killer cell immune synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 15062-7.
- Davis RE, Mysore V, Browning JC, Hsieh JC, Lu QA, Katsikis PD. In situ staining for poly(ADP-ribose) polymerase activity using an NAD analogue. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 1279-89.
- de Murcia G, Schreiber V, Molinete M, Saulier B, Poch O, Masson M, et al. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem* 1994; 138: 15-24.
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97: 587-600.
- Domenighini M, Rappuoli R. Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding site of ADP-ribosylating enzymes, expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages. *Mol Microbiol* 1996; 21: 667-74.
- Donnelly LE, Rendell NB, Murray S, Allport JR, Lo G, Kefalas P, et al. Arginine-specific mono(ADP-ribosyl)transferase activity on the surface of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Biochem J* 1996: 635-41.
- Ferrero E, Malavasi F. The metamorphosis of a molecule: from soluble enzyme to the leukocyte receptor CD38. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 151-61.
- Fujita H, Okamoto H, Tsuyama S. ADP-ribosylation in adrenal glands: purification and characterization of mono-ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolase affecting cytoskeletal actin. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; 27: 1065-78.
- Gierschik P. ADP-ribosylation of signal-transducing guanine nucleotide-binding proteins by pertussis toxin. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 175: 69-96.
- Glowacki G, Braren R, Cetkovic-Cvrlje M, Leiter EH, Haag F, Koch-Nolte F. Structure, chromosomal localization, and expression of the gene for mouse ecto-mono(ADP-ribosyl)transferase ART5. *Gene* 2001; 275: 267-77.
- Glowacki G, Braren R, Firner K, Nissen M, Kuhl M, Reche P, et al. The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci.* 2002; 11: 1657-1670.
- Goding JW, Howard MC. Ecto-enzymes of lymphoid cells. *Immunol. Rev.* 1998; 161: 5-10.
- Grahner A, Friedrich M, Pfister M, Haag F, Koch-Nolte F, Hauschildt S. Mono-ADP-ribosyltransferases in human monocytes: regulation by lipopolysaccharide. *Biochem. J.* 2002; 362: 717-723.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999; 285: 221-7.

- Gubin AN, Njoroge JM, Wojda U, Pack SD, Rios M, Reid ME, et al. Identification of the dombrock blood group glycoprotein as a polymorphic member of the ADP-ribosyltransferase gene family. *Blood* 2000; 96: 2621-7.
- Haag F, Andresen V, Karsten S, Koch-Nolte F, Thiele H. Both allelic forms of the rat T cell differentiation marker RT6 display nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-glycohydrolase activity, yet only RT6.2 is capable of automodification upon incubation with NAD. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 2355-2361.
- Haag F, Freese D, Scheublein F, Ohlrogge W, Adriouch S, Seman M, et al. T cells of different developmental stages differ in sensitivity to apoptosis induced by extracellular NAD. *Dev Immunol* 2002; 9: 197-202.
- Haag F, Koch-Nolte F. The vertebrate gene family of mono(ADP-ribosyl)transferases. Proposal for a unified nomenclature. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997; 419: 459-62.
- Haag F, Koch-Nolte F. Endogenous relatives of ADP-ribosylating bacterial toxins in mice and men: potential regulators of immune cell function. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 1998; 12: 53-62.
- Haag F. K-NF. Two Novel Human Members of an Emerging Mammalian Gene Family Related to Mono-ADP-Ribosylating Bacterial Toxins. *Genomics* 1999; Jan 1;55(1): 370-376.
- Han MK, Cho YS, Kim YS, Yim CY, Kim UH. Interaction of two classes of ADP-ribose transfer reactions in immune signaling. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 20799-20805.
- Hauschildt S, Scheipers P, Bessler WG. Lipopolysaccharide-induced change of ADP-ribosylation of a cytosolic protein in bone-marrow derived macrophages. *Biochem. J.* 1994; 297: 17-20.
- He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997; 90: 739-51.
- Hingorani VN, Ho YK. Fluorescent labeling of signal-transducing G-proteins. Pertussis toxin-catalyzed etheno-ADP ribosylation of transducin. *J Biol Chem* 1988; 263: 19804-8.
- Hollmann C, Haag F, Schlott M, Damaske A, Bertuleit H, Matthes M, et al. Molecular characterization of mouse T-cell ecto-ADP-ribosyltransferase Rt6: cloning of a second functional gene and identification of the Rt6 gene products. *Mol. Immunol.* 1996; 33: 807-17.
- Hu B, Guo P, Bar-Joseph I, Imanishi Y, Jarzynka MJ, Bogler O, et al. Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene* 2007.
- Hudrisier D, Bongrand P. Intercellular transfer of antigen-presenting cell determinants onto T cells: molecular mechanisms and biological significance. *Faseb J* 2002; 16: 477-86.
- Jacobson EL, Jacobson MK. Tissue NAD as a biochemical measure of niacin status in humans. *Methods Enzymol.* 1997; 280: 221-230.
- Jacobson MK, Jacobson EL. *ADP-ribose Transfer Reactions: Mechanisms and Biological Significance.* New York: Springer Verlag, 1989.
- Janes PW, Ley SC, Magee AI, Kabouridis PS. The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol* 2000; 12: 23-34.

- Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; 375: 151-5.
- Kahl S. Charakterisierung der mono-ADP-Ribosyltransferasen mART2.2 und hART4 mithilfe von durch Gene-Gun Immunisierung generierten Antisera und monoklonalen Antikörpern. *FB Medizin* 2002; Diss. 2003.
- Kahl S, Nissen M, Girisch R, Duffy T, Leiter EH, Haag F, et al. Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *J Immunol* 2000; 165: 4463-9.
- Karsten S, Schröder J, da Silva C, Kahlke D, Thiele HG, Koch-Nolte F, et al. Expression and comparative analysis of recombinant rat and mouse RT6 T cell mono(ADP-ribosyl)transferases in *E. coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997; 419: 175-180.
- Karsten S. Expression rekombinanter Formen des Ratten-T-Zell-Differenzierungsmarkers RT6 in eukaryontischen und prokaryontischen Systemen und Analyse seiner ADP-Ribosyltransferase-Aktivität; *FB Medizin* 1999; Diss 1999
- Kawamura H, Aswad F, Minagawa M, Govindarajan S, Dennert G. P2X7 receptors regulate NKT cells in autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006; 176: 2152-60.
- Kawamura H, Aswad F, Minagawa M, Malone K, Kaslow H, Koch-Nolte F, et al. P2X7 receptor-dependent and -independent T cell death is induced by nicotinamide adenine dinucleotide. *J Immunol* 2005; 174: 1971-9.
- Kefalas P, Allport JR, Donnelly LE, Rendell NB, Murray S, Taylor GW, et al. Arginine-specific mono(ADP-ribosyl)transferase activity in human neutrophil polymorphs. A possible link with the assembly of filamentous actin and chemotaxis. *Adv Exp Med Biol* 1997; 419: 241-4.
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *Embo J* 2001; 20: 6347-58.
- Klebl BM, Pette D. A fluorometric assay for measurement of mono-ADP-ribosyltransferase activity. *Anal Biochem* 1996; 239: 145-52.
- Koch F, Haag F, Thiele HG. Nucleotide and deduced amino acid sequence for the mouse homologue of the rat T-cell differentiation marker RT6. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18: 3636.
- Koch-Nolte F, Abromeit M, Gerber A, Kahl S, Ohlrogge W, Glowacki G, et al. Molecular characterization of NAD⁺-metabolizing ectoenzymes in mice and men: endogenous relatives of ADP-ribosylating bacterial toxins. In: Vanduffel L and Lemmens R, editors. *Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases*. Maastricht: Shaker Publishing B.V., 2000: 221-233.
- Koch-Nolte F, Haag F, Braren R, Kuhl M, Hoovers J, Balasubramanian S, et al. Two novel human members of an emerging mammalian gene family related to mono-ADP-ribosylating bacterial toxins. *Genomics* 1997; 39: 370-6.
- Koch-Nolte F, Otto H, Glowacki G, Teczan D, Rhen M, Haag F. Using PSI-Blast to analyze the relation of bacterial toxins and mammalian ADP-ribosyltransferases and to discover a new, potentially interesting family member. In: Griffin D and Labuda M, editors. *The Infectious Disease*

- Review. *Microbes of Man, Animals and the Environment*. Supplement No 3. Canterbury, UK: Tamurlane Press., 2001a: 62-69.
- Koch-Nolte F, Reche P, Haag F, Bazan F. ADP-ribosyltransferases: plastic tools for inactivating protein and small molecular weight targets. *J. Biotechnol.* 2001b; 92: 81-87.
- Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 1997; 90: 753-62.
- Krebs C, Adriouch S, Braasch F, Koestner W, Leiter EH, Seman M, et al. CD38 Controls ADP-Ribosyltransferase-2-Catalyzed ADP-Ribosylation of T Cell Surface Proteins. *J Immunol* 2005; 174: 3298-305.
- Krebs C, Koestner W, Nissen M, Welge V, Parusel I, Malavasi F, et al. Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine. *Anal Biochem* 2003; 314: 108-15.
- la Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 339-43.
- Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 785-95.
- Liu ZX, Azhipa O, Okamoto S, Govindarajan S, Dennert G. Extracellular nicotinamide adenine dinucleotide induces t cell apoptosis in vivo and in vitro. *J Immunol* 2001; 167: 4942-7.
- Liu ZX, Yu Y, Dennert G. A cell surface ADP-ribosyltransferase modulates T cell receptor association and signaling. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 17399-17401.
- Ludden PW. Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in procaryotes. *Mol. Cell. Biochem.* 1994; 138: 123-129.
- Lund F, Solvason N, Grimaldi JC, Parkhouse RME, Howard M. Murine CD38: an immunoregulatory ectoenzyme. *Immunol Today* 1995; 16: 469-473.
- Mac Gabhann F, Popel AS. Differential binding of VEGF isoforms to VEGF receptor 2 in the presence of neuropilin-1: a computational model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H2851-60.
- Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, et al. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 2000; 151: 673-84.
- Mahnke K, Qian Y, Fondel S, Brueck J, Becker C, Enk AH. Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice. *Cancer Res* 2005; 65: 7007-12.
- Matsuyama S, Tsuyama S. Mono-ADP-ribosylation in brain: purification and characterization of ADP-ribosyltransferases affecting actin from rat brain. *J Neurochem* 1991; 57: 1380-7.
- Matzinger P. An innate sense of danger. *Semin Immunol* 1998; 10: 399-415.
- McDonald LJ, Moss J. Enzymatic and nonenzymatic ADP-ribosylation of cysteine. *Mol Cell Biochem* 1994; 138: 221-6.

- McMahon KK, Piron KJ, Ha VT, Fullerton AT. Developmental and biochemical characteristics of the cardiac membrane-bound arginine-specific mono-ADP-ribosyltransferase. *Biochem J* 1993; 293: 789-793.
- Mishima K, Terashima M, Obara S, Yamada K, Imai K, Shimoyama M. Arginine-specific ADP-ribosyltransferase and its acceptor protein p33 in chicken polymorphonuclear cells: co-localization in the cell granules, partial characterization, and in situ mono(ADP-ribosyl)ation. *J Biochem Tokyo* 1991; 110: 388-94.
- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 1998; 395: 82-6.
- Montixi C, Langlet C, Bernard AM, Thimonier J, Dubois C, Wurbel MA, et al. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *Embo J* 1998; 17: 5334-48.
- Moreno-Garcia ME, Partida-Sanchez S, Primack J, Sumoza-Toledo A, Muller-Steffner H, Schuber F, et al. CD38 is expressed as noncovalently associated homodimers on the surface of murine B lymphocytes. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1025-34.
- Moss J, Vaughan M. ADP-ribosylation of guanyl nucleotide-binding regulatory proteins by bacterial toxins. *Advan. Enzymol.* 1988; 61: 303-379.
- Nemoto E, Yu Y, Dennert G. Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells. *J. Immunol.* 1996; 157: 3341-3349.
- Niven DF, Le Blanc L. Identity of V factor in culture medium used for prior growth of two strains of *Staphylococcus aureus*. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42: 642-4.
- Ohlrogge W, Haag F, Lohler J, Seman M, Littman DR, Killeen N, et al. Generation and characterization of ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7535-42.
- Okamoto S, Azhipa O, Yu Y, Russo E, Dennert G. Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function. *J. Immunol.* 1998; 160: 4190-4198.
- Okazaki IJ, Kim HJ, McElvaney NG, Lesma E, Moss J. Molecular characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked ADP-ribosyltransferase from lymphocytes. *Blood* 1996; 88: 915-21.
- Okazaki IJ, Moss J. Structure and function of eukaryotic mono-ADP-ribosyltransferases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1996; 129: 51-104.
- Ortolan E, Vacca P, Capobianco A, Armando E, Crivellin F, Horenstein A, et al. CD157, the Janus of CD38 but with a unique personality. *Cell Biochem Funct* 2002; 20: 309-22.
- Otto H, Tezcan-Merdol D, Girisch R, Haag F, Rhen M, Koch-Nolte F. The spvB gene-product of the salmonella enterica virulence plasmid is a mono(ADP-ribosyl)transferase. *Mol. Microbiol.* 2000; 37: 1106-1115.
- Paone G, Wada A, Stevens LA, Matin A, Hirayama T, Levine RL, et al. ADP ribosylation of human neutrophil peptide-1 regulates its biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2002; 99: 8231-8235.
- Partida-Sanchez S, Cockayne DA, Monard S, Jacobson EL, Oppenheimer N, Garvy B, et al. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular

- calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med* 2001; 7: 1209-16.
- Partida-Sanchez S, Goodrich S, Kusser K, Oppenheimer N, Randall TD, Lund FE. Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity. *Immunity* 2004; 20: 279-91.
- Parusel I, Kahl S, Braasch F, Glowacki G, Halverson GR, Reid ME, et al. A panel of monoclonal antibodies recognizing GPI-anchored ADP-ribosyltransferase ART4, the carrier of the Dombrock blood group antigens. *Cell Immunol* 2005.
- Pellat DC, Wietzerbin J, Drapier JC. Nicotinamide inhibits nitric oxide synthase mRNA induction in activated macrophages. *Biochem J* 1994.
- Prochazka M, Gaskins HR, Leiter EH, Koch-Nolte F, Haag F, Thiele HG. Chromosomal localization, DNA polymorphism, and expression of Rt-6, the mouse homologue of rat T-lymphocyte differentiation marker RT6. *Immunogenetics* 1991; 33: 152-156.
- Quan S, Imai T, Mikami Y, Yazawa K, Dabbs ER, Morisaki N, et al. ADP-ribosylation as an intermediate step in inactivation of rifampin by a mycobacterial gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43: 181-4.
- Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, et al. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 1999; 189: 371-80.
- Rescigno M, Citterio S, Thery C, Rittig M, Medaglini D, Pozzi G, et al. Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 5229-34.
- Rietveld A, Simons K. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1376: 467-79.
- Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 362-8.
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; 182: 389-400.
- Saxty BA, Yadollahi-Farsani M, Upton PD, Johnstone SR, MacDermot J. Inactivation of platelet-derived growth factor-BB following modification by ADP-ribosyltransferase. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 133: 1219-1226.
- Schroeder R, London E, Brown D. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12130-4.

- Schuber F, Lund FE. Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr Mol Med* 2004; 4: 249-61.
- Schubert W, Bonnekoh B, Pommer AJ, Philipsen L, Bockelmann R, Malykh Y, et al. Analyzing proteome topology and function by automated multidimensional fluorescence microscopy. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1270-8.
- Seman M, Adriouch S, Haag F, Koch-Nolte F. Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling. *Curr Med Chem* 2004; 11: 857-72.
- Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, et al. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* 2003; 19: 571-82.
- Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387: 569-72.
- Spinelli SL, Kierzek R, Turner DH, Phizicky EM. Transient ADP-ribosylation of a 2'-phosphate implicated in its removal from ligated tRNA during splicing in yeast. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 2637-44.
- Stefanova I, Horejsi V, Ansotegui IJ, Knapp W, Stockinger H. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* 1991; 254: 1016-9.
- Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med* 2001; 68: 160-6.
- Terashima M, Badruzzaman M, Tsuchiya M, Shimoyama M. Exocytosis of arginine-specific ADP-ribosyltransferase and p33 induced by A23187 and calcium or serum-opsonized zymosan in chicken polymorphonuclear leukocytes. *J Biochem (Tokyo)* 1996; 120: 1209-15.
- Terashima M, Hara N, Badruzzaman M, Shimoyama M, Tsuchiya M. ADP-ribosylation of tuftsin suppresses its receptor-binding capacity and phagocytosis-stimulating activity to murine peritoneal macrophages. *FEBS Lett* 1997; 412: 227-32.
- Tezcan-Merdol D, Nyman T, Lindberg U, Haag F, Koch-Nolte F, Rhen M. Actin is ADP-ribosylated by the *Salmonella enterica* virulence-associated protein SpvB. *Mol Microbiol* 2001; 39: 606-19.
- Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V, Cambot M, Gaulard P, Hermine O, et al. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 2002; 3: 477-82.
- Trumpfheller C, Finke JS, Lopez CB, Moran TM, Moltedo B, Soares H, et al. Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med* 2006; 203: 607-17.
- Tsuchiya M, Hara N, Yamada K, Osago H, Shimoyama M. Cloning and expression of cDNA for arginine-specific ADP-ribosyltransferase from chicken bone marrow cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 27451-27457.
- van den Berg CW, Cinek T, Hallett MB, Horejsi V, Morgan BP. Exogenous glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD59 associates with kinases in membrane clusters on U937 cells and becomes Ca(2+)-signaling competent. *J Cell Biol* 1995; 131: 669-77.

- Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 1988; 55: 301-8.
- Wang J, Nemoto E, Dennert G. Regulation of CTL by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) involves ADP-ribosylation of a p56lck-associated protein. *J. Immunol.* 1996; 156: 2819-2827.
- Wang J, Nemoto E, Kots AY, Kaslow HR, Dennert G. Regulation of cytotoxic T cells by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) correlates with cell surface GPI-anchored/arginine ADP-ribosyltransferase. *J. Immunol.* 1994; 153: 4048-4058.
- Weng B, Thompson WC, Kim HJ, Levine RL, Moss J. Modification of the ADP-ribosyltransferase and NAD glycohydrolase activities of a mammalian transferase (ADP-ribosyltransferase 5) by auto-ADP-ribosylation. *J Biol Chem* 1999; 274: 31797-803.
- Witmer-Pack MD, Swiggard WJ, Mirza A, Inaba K, Steinman RM. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cell Immunol* 1995; 163: 157-62.
- Yamamoto-Katayama S, Ariyoshi M, Ishihara K, Hirano T, Jingami H, Morikawa K. Crystallographic studies on human BST-1/CD157 with ADP-ribosyl cyclase and NAD glycohydrolase activities. *J Mol Biol* 2002; 316: 711-23.
- Young TL, Santella RM. Development of techniques to monitor for exposure to vinyl chloride: monoclonal antibodies to ethenoadenosine and ethenocytidine. *Carcinogenesis* 1988; 9: 589-92.
- Yu Y, Okamoto S, Nemoto E, Dennert G. Molecular cloning of a functional murine arginine-specific mono-ADP- ribosyltransferase and its expression in lymphoid cells. *DNA Cell. Biol.* 1997; 16: 235-44.
- Zanovello P, Bronte V, Rosato A, Pizzo P, Di Virgilio F. Responses of mouse lymphocytes to extracellular ATP. II. Extracellular ATP causes cell type-dependent lysis and DNA fragmentation. *J Immunol* 1990; 145: 1545-50.
- Ziegler M. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 1550-64.
- Zolkiewska A, Moss J. Integrin alpha 7 as substrate for a glycosylphosphatidylinositol-anchored ADP-ribosyltransferase on the surface of skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 25273-25276.
- Zolkiewska A, Nightingale MS, Moss J. Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 11352-11356.

9 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Prof. Dr. Friedrich Haag, der mich in allen Belangen hervorragend unterstützte, mir einen großen Freiraum gab, eigene Ideen umzusetzen und dabei trotzdem immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Friedrich Nolte, der mich ebenfalls stark unterstützte und der mir zu jeder Zeit wertvolle Anregungen, Tips und Interpretationen zu meiner Arbeit gab.

Des Weiteren möchte ich Vivienne Welge, Fenja Braasch, Gudrun Dubberke, Fabienne Seyfried für die exzellente technische Unterstützung, für Ratschläge und Unterstützung während meiner Arbeit im Labor danken. Bei allen Mitgliedern des Diagnostiklabors und des Forschungslabors des Instituts für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf bedanke ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit im Labor.

Bedanken möchte ich mich ferner bei Fritz Buck, der die massenspektroskopischen Untersuchungen durchgeführt hat, bei Niklas Engels, der mich in die Techniken zur Tyrosinphosphorylierung eingeführt hat und bei Burkhard Schraven, der uns den PAG-Antikörper zur Verfügung stellte.

Schließlich möchte ich meiner Frau Eva für die langjährige persönliche Unterstützung bei dieser Arbeit danken.

10 Lebenslauf

Name: Wolfgang Koestner
Adresse: Stolzestrasse 10, 30171 Hannover
Tel.: 0511-7693789
Geburtsdatum und -ort: 19.06.1976 in Hannover

Schulbildung

1983 - 1987 Grundsule (Hannover)
1987 - 1996 Gymnasium (Hannover)
Mai 1996 Abschluß: Abitur

Zivildienst

1996 - 1997 Tagesförderstätte für mehrfach schwerstbehinderte Menschen, (Hannover)

Studium

10.1997 – 10.2003 Studium der Humanmedizin am
Universitätskrankenhaus Hamburg Eppendorf (UKE)
10.2003 – 11.2004 Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum
Schleswig-Holstein (UK-SH), Campus Lübeck
11.2004 Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeit

12.2004 – 10.2006 Assistenzarzt in der Akutneurologie
im Neurologischen Zentrum Bad Segeberg
Seit 10.2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Pädiatrischen
Hämatologie und Onkologie,
Medizinische Hochschule Hannover (MHH)

11 Publikationen und Präsentationen:

Publikationen

„Flow cytometric and immunoblot assays for cell surface ADP-ribosylation using a monoclonal antibody specific for ethenoadenosine.“

Krebs C, **Koestner W**, Nissen M, Welge V, Parusel I, Malavasi F, Leiter EH, Santella RM, Haag F, Koch-Nolte F.: Anal Biochem. 2003 Mar 1;314(1):108-15. (PMID: 12633608)

„CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins.“

Krebs C, Adriouch S, Braasch F, **Koestner W**, Leiter EH, Seman M, Lund FE, Oppenheimer N, Haag F, Koch-Nolte F.: J Immunol. 2005 Mar 15;174(6):3298-305. (PMID: 15749861)

Präsentationen

2001 Präsentation: 5th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar 2001:

W. Koestner, Niklas Engels, F. Koch-Nolte, F. Haag: “Intracellular Tyrosinephosphorylation meets ADP-ribosylation”

2002 Präsentation: Deutsche Gesellschaft für Immunologie in Halle, Germany:

W. Koestner, C. Krebs, Niklas Engels, F. Haag & F. Koch-Nolte: „Interactions between targetproteins of ARTs and Tyrosinkinases“

2002 Präsentation: Deutsche Gesellschaft für Immunologie in Halle, Germany:

C. Krebs, **W. Koestner**, M. Nissen, V. Welge, D. Freese, F. Haag & F. Koch-Nolte: “A FACS-assay to monitor the activity of GPI-anchored ecto-ADP-ribosyltransferases on lymphocytes”

Awards

Second poster-price in the 5th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar 2001

12 ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift.....